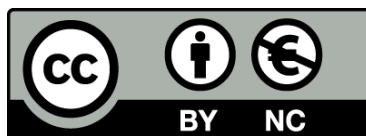




UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Respuestas de los primates a demandas sociales y ecológicas: La importancia de los métodos no invasivos

Elizabeth Flores Escobar



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License.**

**Respuestas de los primates a demandas sociales y
ecológicas: la importancia de los métodos no
invasivos**

Elizabeth Flores Escobar

Tesis Doctoral, 2019



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0. Spain License.**

Flores Escobar E (2019) Respuestas de los primates a demandas sociales y ecológicas: la importancia de los métodos no invasivos. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, 196 p.



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

**Respuestas de los primates a demandas sociales y
ecológicas: la importancia de los métodos no invasivos**

Memoria presentada por

Elizabeth Flores Escobar

para optar al grado de
Doctora por la Universidad de Barcelona

Facultad de Biología
Departamento de Biología Evolutiva, Ecología y Ciencias
Ambientales

Programa de Doctorado en Biodiversidad
Barcelona, septiembre 2019

Director

Doctoranda

Tutora

Dr. Pedro Américo
Duarte Dias
Instituto de
Neuroetología
Universidad
Veracruzana

Elizabeth
Flores
Escobar

Dra. Carolina
Sanpera Trigueros
Universitat de
Barcelona

Resumen

La baja disponibilidad de alimento genera un entorno estresante que tiene efectos directos sobre los primates, como son los cambios hormonales, conductuales, interacción social y en la utilización de recursos.

Las técnicas no invasivas, desarrolladas para obtener información sobre la fisiología de la fauna silvestre, han contribuido a ampliar nuestra comprensión de las causas de la conducta de los primates y su capacidad para responder a las presiones medio ambientales. El presente trabajo contribuye al conocimiento sobre estas especies a través de tres enfoques: fisiológico, socio endócrino e isotópico.

En este trabajo, en primer lugar, se realizaron las validaciones fisiológicas, analíticas y de los métodos de extracción para la determinación de hormonas esteroides en heces de monos aulladores negros (*Alouatta pigra*), con la finalidad de establecer parámetros para la correcta evaluación de estos esteroides.

En la segunda parte se realizó un experimento en un grupo de monos araña negros (*Ateles geoffroyi*). Se usaron cinco combinaciones de tamaño, distribución y calidad de los alimentos. Se observaron interacciones sociales, se recolectaron registros de actividad de alimentación y proximidad, y se colectaron muestras fecales. Cuando los alimentos estaban agrupados, los individuos pasaban menos tiempo alimentándose, y también había una variación individual en la actividad alimentaria dentro de los tratamientos. Los niveles de glucocorticoides fecales fueron más altos cuando los alimentos estaban agrupados.

Por último, se midió la amplitud del nicho isotópico en monos aulladores de manto (*Alouatta palliata*) y negros (*A. pigra*) en alopatria y simpatria, a través de mediciones isotópicas en pelo y se estimó el grado de solapamiento entre las diferentes condiciones, así como de ambas especies en el área de simpatria. En simpatria, los monos aulladores negros tuvieron un nicho isotópico significativamente más amplio, que

estaba determinado principalmente por los altos valores de $\delta^{15}\text{N}$, e incluía la mayor parte del nicho isotópico de los monos aulladores de manto. Cada especie presenta diferente forma y tamaño de nicho isotópico en el área donde convergen ambas especies. La coexistencia de estas especies ecológicamente similares está vinculada a ajustes de nicho trófico por *Alouatta pigra*.

La adquisición de un mayor conocimiento a diferentes escalas de las respuestas fisiológicas, sociales y la forma en que estos primates acceden a los alimentos frente a los cambios medioambientales, es fundamental para comprender los aspectos más básicos de su conducta y tiene implicaciones importantes para el estudio de la ecología y evolución de estas especies. Asimismo, la información generada en esta tesis tiene implicaciones para la conservación y manejo de los primates mexicanos.

Summary

Low food availability has direct effects on primates, such as changes in hormones and behavior.

Non-invasive techniques, developed to obtain information on the physiology of wildlife, have contributed to broadening our understanding of the causes of primate behavior and their ability to respond to environmental pressures. The present work contributes to the knowledge about these species through three approaches: physiological, socio-endocrine and isotopic.

In the first part of this thesis, physiological and analytical validations, as well as extraction methods, were performed for the determination of steroid hormones in feces of black howler monkeys (*Alouatta pigra*), in order to establish parameters for the correct evaluation of these steroids.

In the second part, an experiment was carried out on a group of black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). Five combinations of food size, distribution, and quality were used. Social interactions were observed, records of feeding activity and proximity were collected, as well as fecal samples. When food was clumped, individuals spent less time feeding, and there was also individual variation in feeding activity within treatments. Fecal glucocorticoid levels were higher when food was clumped.

Finally, the isotopic niche width was measured in mantled (*Alouatta palliata*) and black (*A. pigra*) howler monkeys in allopatry and sympatry through isotopic measurements in hair. The degree of isotopic niche overlap between the different conditions was also estimated, as well as of both species in the sympatry area. In sympatry, black howler monkeys had a significantly wider isotopic niche, which was determined primarily by high $\delta^{15}\text{N}$ values, and included most of the isotopic niche of mantled howler monkeys. Each species had a different shape and size of isotopic niche in the area where both species converge. The coexistence

of these ecologically similar species is linked to trophic niche adjustments by *Alouatta pigra*.

The acquisition of greater knowledge at different scales of physiological, social responses and the way in which these primates access food while coping with environmental changes, is essential to understand the most basic aspects of their behavior and has important implications for the study of the ecology and evolution of these species. Likewise, the information generated in this thesis has implications for the conservation and management of Mexican primates.

Índice

Capítulo 1. Introducción general	1
1.1 Las selvas tropicales: hábitat de los primates mexicanos.....	4
1.2 Biología y ecología de los primates silvestres de México.....	5
1.2.1 Monos aulladores (<i>A. pigra</i> y <i>A. palliata</i>).....	6
1.2.2 Monos araña (<i>Ateles geoffroyi</i>).....	8
1.3 La perturbación del hábitat y sus efectos sobre los primates mexicanos	11
1.4 Consecuencias de la variación en la disponibilidad de alimento asociada a la perturbación antropogénica	12
1.4.1 Estrés fisiológico	13
1.4.2 Alteraciones en el comportamiento reproductivo.....	17
1.4.2.1 Evaluación de la concentración de hormonas esteroides por métodos no invasivos para medir estrés y actividad reproductiva en vida silvestre	18
1.4.2.2 Validación del método	19
1.4.2.3 Evaluación del estrés originado por la variación en la disponibilidad de alimento	20
1.4.3 Segregación trófica en función de la disponibilidad de alimento	24
1.4.3.1 Isótopos estables en Ecología.....	28
1.4.3.2 Isótopos estables en Primatología.....	29
1.4.3.3 Isótopos estables, segregación trófica y perturbación del hábitat	32
1.5 Problema y justificación.....	35
1.6 Objetivos.....	38
1.6.1 Objetivos generales.....	38
1.6.2 Objetivos particulares	38

1.7	Descripción de la Tesis.....	40
1.8	Referencias	42
Capítulo 2. Validación fisiológica y analítica de métodos de extracción y determinación de hormonas esteroides en heces de mono aullador negro (<i>Alouatta pigra</i>)		
		63
2.1	Resumen	65
2.2	Introducción.....	66
2.3	Materiales y métodos	68
2.3.1	Estatutos Éticos	68
2.3.2	Colecta de muestras fecales	68
2.3.3	Validación de los métodos de extracción	69
2.3.4	Ensayos.....	70
2.3.5	Extracción de las hormonas esteroides para las validaciones analíticas.....	70
2.3.6	Validaciones analíticas de RIA y SPCEI.....	71
2.3.7	Validaciones fisiológicas	72
2.3.7.1	Cortisol.....	72
2.3.7.2	Testosterona.....	73
2.3.7.3	Estradiol y Progesterona	73
2.3.8	Análisis de datos.....	74
2.4	Resultados	74
2.4.1	Validación métodos de extracción.....	74
2.4.2	Validación analítica	75
2.4.3	Validación fisiológica.....	75
2.5	Discusión.....	79
2.6	Referencias	84

Capítulo 3. Respuesta a corto plazo frente a la variación en la disponibilidad de alimento89

3.1	Resumen	91
3.2	Introducción.....	92
3.3	Materiales y métodos	96
3.3.1	Estatutos Éticos	96
3.3.2	Manejo de los individuos de estudio	96
3.3.3	Estudio Piloto.....	98
3.3.4	Configuración experimental	99
3.3.5	Observaciones conductuales	101
3.3.6	Colecta de muestras fecales, Procesamiento y Análisis ..	101
3.3.7	Análisis Estadísticos.....	104
3.4	Resultados.....	105
3.5	Discusión	106
3.6	Referencias.....	112

Capítulo 4. Partición de nichos isotópicos en dos especies simpátricas de monos aulladores 119

4.1	Resumen	121
4.2	Introducción.....	122
4.3	Materiales y métodos	125
4.3.1	Nota ética	125
4.3.2	Sitios de estudio.....	125
4.3.2.1	Tabasco.....	127
4.3.2.2	Campeche.....	128
4.3.2.3	Veracruz	129
4.3.2.4	Guatemala	130
4.3.3	Toma de muestras	130
4.3.4	Análisis de isótopos estables.....	132

4.3.5	Análisis de datos.....	133
4.4	Resultados	135
4.5	Discusión.....	140
4.6	Referencias	144
Capítulo 5. Discusión y sugerencias para futuros estudio		153
5.1	Validación fisiológica y analítica de los métodos de extracción y determinación hormonal	156
5.1.1.	Sugerencias para futuros estudios.....	160
5.2	Respuesta frente a la variación en la disponibilidad de alimento	162
5.2.1	Sugerencias para futuros estudios.....	165
5.3	Partición de nichos isotópicos en dos especies simpátricas de monos aulladores.....	167
5.3.1	Sugerencias para futuros estudios.....	170
5.4	Referencias	174
Capítulo 6. Conclusiones generales		189
Anexos.....		193

Lista de Figuras, Cuadros y Tablas

Figuras

1.1 Mapa del rango de distribución geográfica de los primates mexicanos.....	5
1.2 Especies de monos aulladores presentes en México: <i>A. palliata</i> y <i>A. pigra</i>	7
1.3 Especies de monos araña presentes en México: <i>A. g. vellerosus</i> y <i>A. g. yucatanensis</i>	9
1.4 Rutas hormonales e interacciones entre ellas.....	16
1.5 Tipos de competencia y sus correlatos sociales.....	23
1.6 Composición de un átomo y formas ligeras, pesadas y radioactivas del elemento carbono.....	26
2.1 Procesamiento para estudios hormonales.....	72
2.2 Validaciones fisiológicas.....	79
3.1 Instalaciones en semi-libertad.....	97
3.2 Bandeja de aprovisionamiento.	98
4.1 Ubicación de los grupos muestreados.	126
4.2 Variación en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (A) y $\delta^{15}\text{N}$ (B) entre las dos especies de monos aulladores que viven en alopatria y simpatria.	137
4.3 Variación en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de muestras de pelo de mono aullador y elipses bivariadas (SEAc) estimadas a través del análisis SIBER (Stable Isotope Bayesian Ellipses in R).	138
4.4 Gráficos de densidad que muestran los intervalos de credibilidad de las áreas de elipse de desviación estándar para monos aulladores alopatricos y simétricos estimados por análisis SIBER.	139

4.5 Solapamiento (números dentro de los recuadros) de las áreas de elipse de desviación estándar (SEAc) de monos aulladores alopáticos y simpátricos estimados por análisis SIBER.	139
4.6 Similitud y Anidación de nichos isotópicos.	140

Cuadros

1.1 Rutas hormonales e interacciones entre ellas.....	14
1.2 Tipos de competencia y sus correlatos sociales.....	21
1.3 ¿Qué son los isótopos estables?.....	25
1.4 Efecto dosel.....	31
4.1 Fases de crecimiento capilar.....	131

Tablas

2.1 Porcentaje de recuperación.....	75
2.2 Validación de los métodos RIA y SPCEI.....	77
2.3 Desempeño general de RIA y SPCEI.....	78
3.1 Tratamientos experimentales.....	100
3.2 Interacciones sociales registradas en el presente estudio.....	102
3.3 Estadísticos descriptivos.....	107
3.4 Resultados GLMM.....	108
4.1. Valores isotópicos en pelo.....	136
A1. Crecimiento de pelo en dos monos aulladores.	194
A2. Datos resumidos de los 36 grupos de monos aulladores analizados.	196

Capítulo 1

Introducción general

La tasa actual de pérdida y fragmentación de hábitat en el mundo originada por la actividad humana (Foley *et al.*, 2005) hace que sea crucial estudiar el vínculo entre la disponibilidad de alimento y sus efectos en los organismos que viven en hábitats fragmentados.

Resulta especialmente importante estudiar los efectos a largo plazo ya que son sumamente perjudiciales, debido a que la capacidad de la especie humana de alterar la naturaleza desde el comienzo de la Revolución Industrial ha alcanzado un ritmo que no queda margen de recuperación para el planeta (Ellis *et al.*, 2010).

Dentro de los impactos antrópicos como la contaminación de aire, tierra y agua, la cacería furtiva, comercio ilegal de especies; la sobreexplotación de recursos naturales es la principal amenaza para el resto de las especies que cohabitan con la especie humana (Leakey & Lewin 1998). Aunque a largo plazo, el cambio climático global es quizás el desafío más grave, la deforestación es la amenaza más inmediata a la que se enfrentan los sistemas ecológicos y las correspondientes especies que los integran, incluyendo los primates no humanos (Kamilar & Beaudrot 2018).

Existen estudios acerca de cómo la restricción de recursos (en riqueza y abundancia), derivada de dicha transformación del medio ambiente, influyen en las conductas alimentarias, gasto de energía, dieta, amplitud de nicho trófico y relaciones coevolutivas entre organismos (Bolzinovic *et al* 2011; Sassi *et al* 2010; Dias *et al.*, 2014, 2016).

Paradójicamente, muchas veces los métodos utilizados para explorar esos efectos resultan ser invasivos, y por tanto provocar consecuencias contraproducentes en aras de obtener información. Sumado a esto, las especies de estudio pueden resultar de difícil acceso o estar sometidas a restricciones legislativas que dificulten la obtención de permisos para el monitoreo a largo plazo.

Sin embargo, los métodos no invasivos desarrollados en las últimas décadas para obtener información cada vez más detallada, han contribuido a ampliar enormemente nuestra comprensión de las causas inmediatas y últimas de la conducta de los primates no humanos y su

capacidad para adaptarse a las presiones medio ambientales que los rodean.

1.1 Las selvas tropicales: hábitat de los primates mexicanos

Entre los ecosistemas de mayor productividad biológica y diversidad de especies del planeta se encuentran las selvas húmedas (Challenger, 1998; Mittermeier *et al.*, 1998). No obstante, muchas de estas mismas selvas también están consideradas como las zonas más críticamente amenazadas por la perturbación del hábitat (Ellis *et al.*, 2010).

México es uno de los 10 países megadiversos del mundo, gracias a que tiene una posición geográfica privilegiada que favorece la presencia de una gran diversidad de especies, debido entre otras cosas, a que es un punto de contacto entre dos regiones biogeográficas: zona neártica y neotropical. Ahí, confluye la historia evolutiva de fauna y flora de dos continentes que estuvieron aislados durante mucho tiempo: Norteamérica y Sudamérica (Challenger, 1998).

Sin embargo, en las últimas décadas, el incremento de la población humana en la periferia y en la zona de influencia de las selvas tropicales mexicanas ha ocasionado la reducción de la flora y fauna a niveles alarmantes debido a la deforestación para la conversión a pastizales para el ganado, así como la extracción de madera selectiva de grandes árboles, que la población local utiliza para comercio, combustible o construcción (Ibarra-Manríquez *et al.*, 1997; Challenger 1998; Ceballos & List, 2008). Todo esto en su conjunto representa la mayor amenaza que pone en riesgo la conservación de las selvas mexicanas, así como la biodiversidad y los servicios ambientales que proveen.

1.2 Biología y ecología de los primates silvestres de México

Las selvas de México resguardan la distribución más septentrional de los platirrinos en el Neotrópico, representada por tres especies: el mono aullador de manto (*Alouatta palliata*), el mono aullador negro (*Alouatta pigra*) y el mono araña (*Ateles geoffroyi*) presentes en el sureste del país, en los estados de Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Quintana Roo, Yucatán y Campeche (Ceballos & Oliva 2005) (Fig. 1.1).

Estos primates pertenecen a la familia de los atélidos (Atelidae) que está formada por dos subfamilias y cuatro géneros: 1) Alouattinae (género *Alouatta*) y 2) Atelinae (géneros *Ateles*, *Brachyteles* y *Lagothrix*). Los atélidos se distinguen del resto de monos neotropicales por su gran tamaño (hasta 6,12 kg) y por su sistema de locomoción basado en la braquiación y la suspensión (Llorente 2019).

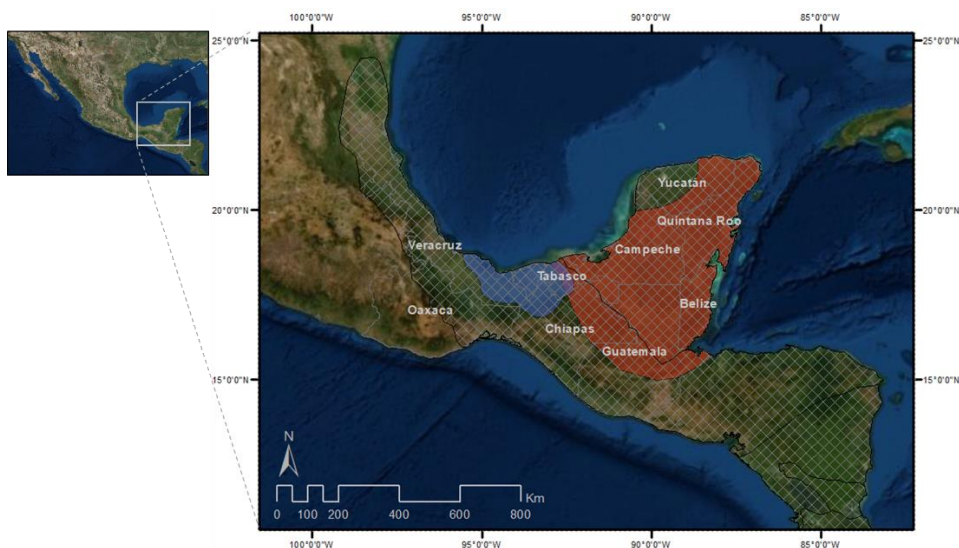


Figura 1.1 Mapa del rango de distribución geográfica de los primates mexicanos. Monos aulladores de manto (*Alouatta palliata*) en azul, monos aulladores negros (*Alouatta pigra*) en rojo, Monos araña (*Ateles geoffroyi*) en cuadrícula. Fuente: IUCN (2017). Esri, DigitalGlobe, GeoEye, Earthstar Geographics; CNES/Airbus DS, USDA, USGS, AeroGRID, IGN, and the GIS User Community.

1.2.1 Monos aulladores (*A. pigra* y *A. palliata*)

El género *Alouatta* es considerado el más exitoso entre los primates del Nuevo Mundo en términos de dominancia ecológica considerando la biomasa global (Kowalewski *et al.*, 2015). Los monos aulladores se distribuyen prácticamente en todo el continente americano. En cada país de Latinoamérica, excepto Chile, habita al menos una especie de *Alouatta* y en algunos casos dos o más. Ocupan una gran diversidad de tipos de hábitat a través del neotrópico y sobreviven en pequeños fragmentos de bosque que no podrían sustentar a otros primates (Bicca-Marques 2003; Crockett 1998; Neville *et al.*, 1988).

Estos monos persisten en una amplia gama de tipos de hábitat (incluidos bosques altamente perturbados antropogenicamente, bosque nuboso (hasta 3.200 m), selva baja, bosque tropical seco estacionalmente caducifolio, bosque cerrado y bosque de caatinga), y tienen la distribución geográfica más extendida de todos los géneros de primates del Nuevo Mundo (Crockett 1998; Rylands *et al.*, 2005; Di Fiore *et al.* 2010).

En México, la especie *A. palliata* es de distribución geográfica amplia y se presenta en casi todo el sur del país y en el resto de Centroamérica, teniendo su representación más norteña en la región de Los Tuxtlas, Veracruz (Estrada & Coates-Estrada, 1988). En contraste, la especie *A. pigra* es de distribución geográfica restringida en el sur de México presentándose solamente en los estados de Tabasco, norte de Chiapas y en la península de Yucatán (Smith, 1970). Además, esta especie también está presente en las selvas del Petén en Guatemala y Belice (Horwich & Johnson, 1986). Esta distribución geográfica restringida apunta a que *A. pigra* es una especie endémica de esta región.

Alouatta pigra suele vivir en grupos más pequeños que *A. palliata*: 2-10 individuos por grupo comparado con 2-45 para *A. palliata* (media de 12.3) (Chapman & Balcomb 1998; Pavelka *et al.*, 2003). Los monos aulladores generalmente tienen ámbitos hogareños pequeños a comparación con otros primates de tamaño similar, y ampliamente superpuestos, de entre 5-45 ha, dependiendo del tipo de hábitat (Neville *et al.* 1988) (Fig. 1.2).

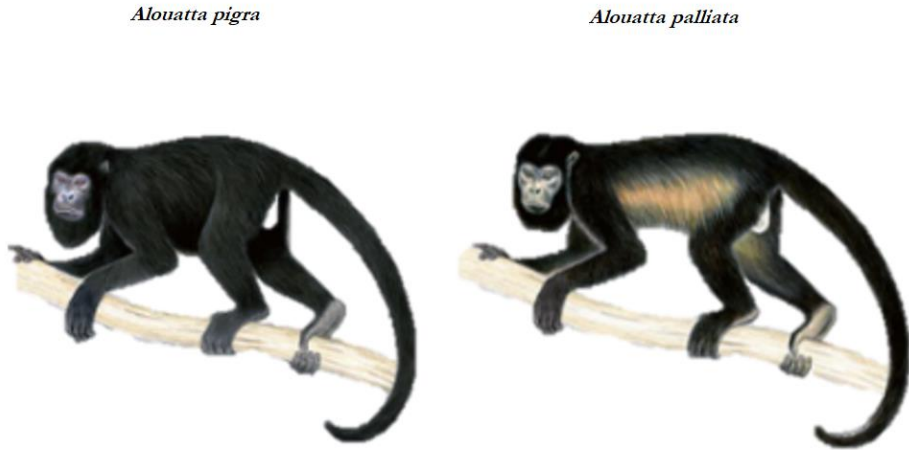


Figura 1.2 Especies de monos aulladores presentes en México. Modificado de: Kowalewski M, Garber P, Cortés-Ortiz L, Urbani B, Youlatos D (eds) *Howler monkeys: behavior, ecology and conservation*. Springer, New York 2015. (Ilustraciones: Stephen D. Nash).

La amplia distribución y gran variedad de tipos de vegetación que habita este género afectan a su dieta. Su éxito ecológico proviene, en gran medida, de su habilidad para sobrevivir por largos periodos consumiendo hojas como fuente primaria de alimento, llegando a constituir hasta un 70% de su dieta anual (Reid, 1997; Silver *et al.*, 1998); habilidad inusual para un primate neotropical (Emmons & Feer, 1990; Mittermeier *et al.*, 2013).

Los monos aulladores cuentan con un intestino grueso agrandado, adaptación que les permite obtener energía a partir de la fermentación de las hojas que consumen (Milton 1998; Milton & McBee, 1983). En muchas regiones, la fruta madura es otro alimento importante, especialmente los higos silvestres del género *Ficus* (Cristóbal-Azkarate & Arroyo-Rodríguez, 2007; Estrada *et al.*, 1999; Milton 1980), pero también comen peciolos, brotes, flores (a veces estacionalmente muy importantes), semillas, musgo, tallos, ramas e incluso también se ha documentado la ingesta de accidental de artrópodos al momento de consumir alimentos vegetales (Milton 1980).

Una característica anatómica particular de los monos aulladores, especialmente en los machos, es el desarrollo significativo del hueso hioides. Esta estructura actúa como resonador y amplificador de vocalizaciones de larga distancia, implicadas en la comunicación intergrupal (Crockett & Eisenberg 1987). A pesar de ser conocidos por sus fuertes vocalizaciones que son audibles a distancias de 1-2 km (Bergman *et al.*, 2016), los monos aulladores son sumamente silenciosos la mayor parte del tiempo. A lo largo del año, destinan un alto porcentaje (60-70%) del día al descanso o a dormir para conservar energía (Asensio *et al.*, 2007; Cristóbal-Azkarate & Arroyo-Rodríguez, 2007). Este patrón de inactividad es una característica importante de su estrategia general de forrajeo (Bicca-Marques 2003; Milton 1980). Basan su actividad en periodos alternados de alimentación y desplazamiento.

1.2.2 Monos araña (*Ateles geoffroyi*)

En México está presente una especie de mono araña *Ateles geoffroyi*, con dos subespecies, *A. g. vellerosus* y *A. g. yucatanensis* (Fig. 1.3) (Kellog & Goldman 1944). Aunque la distribución de la primera abarcaba originalmente desde Tamaulipas hasta Chiapas, actualmente se distribuye a lo largo de la mayor parte del sur de México, incluidas las dos costas del sureste mexicano, mientras que la última está restringida a la península de Yucatán (Konstant & Mittermeier, 1985). Como en el caso de las dos especies del género *Alouatta*, México resguarda la distribución geográfica más septentrional del género *Ateles* en el continente americano.

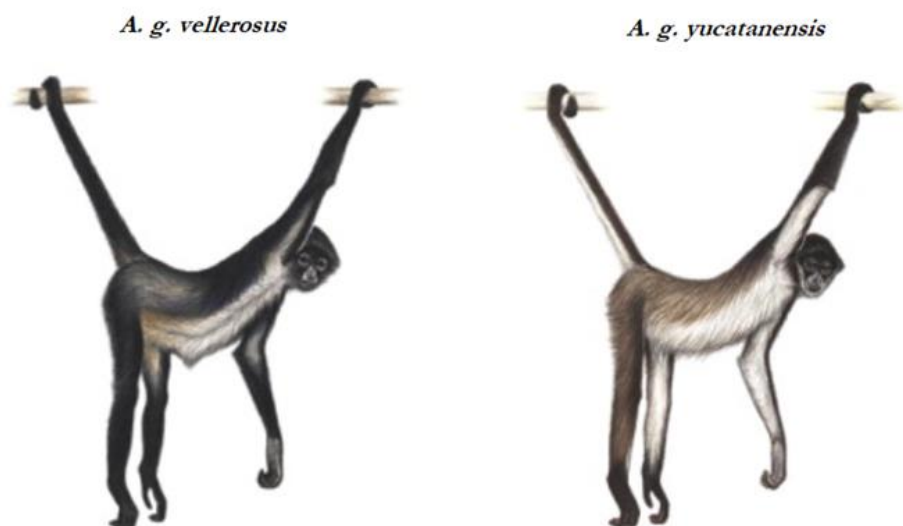


Figura 1.3 Subespecies de monos araña presentes en México: *A. g. vellerosus* y *A. g. yucatanensis*. Modificado de: Schwitzer, C., Mittermeier, R.A., Rylands, A.B., Chiozza, F., Williamson, E.A., Macfie, E.J., Wallis, J. and Cotton, A. (eds.). 2017. *Primates in Peril: The World's 25 Most Endangered Primates 2016–2018*. IUCN SSC Primate Specialist Group (PSG), International Primatological Society (IPS), Conservation International (CI), and Bristol Zoological Society, Arlington, VA. 99 p. (Ilustraciones: Stephen D. Nash).

Los monos araña habitan diversos hábitats, como la selva alta perennifolia, la selva baja perennifolia o la selva baja inundable (Estrada & Coates-Estrada 1988). En México se han reportado especímenes en elevaciones de hasta 1,200 msnm (Kellog & Goldman, 1944).

A. geoffroyi cuenta con un cuerpo delgado con extremidades largas y delgadas. Presenta mano prensil y dedo pulgar ausente. Como los monos aulladores, también cuentan con cola prensil con un parche de piel desnudo debajo de la superficie de la punta, que funciona como una quinta mano. Tiene un abdomen prominente, cabeza pequeña y un pelaje variado en cuanto a color, textura y longitud aún dentro de la misma especie; el pelo de la corona está dirigido hacia adelante. Posee un peso corporal de entre 5 y 8 kg, siendo las hembras ligeramente más

grandes que los machos. Como característica, tienen las glándulas odoríferas en la región pectoral (Mittermeier *et al.*, 2013).

El mono araña es un primate arbóreo y prefiere casi exclusivamente el nivel más alto de los árboles (Medeiros *et al* 1997). Todas las especies de *Ateles* son principalmente frugívoras, se alimentan sobre todo de frutos maduros y sus partes blandas (55-90% de la dieta), pero también consumen hojas tiernas y en menor proporción pueden consumir flores, semillas, pseudo bulbos, capullos, raíces aéreas, cortezas, madera podrida y miel (Di Fiore *et al.*, 2008; van Roosmalen & Klein, 1987).

La alimentación en sí misma es una actividad que tiene efectos importantes sobre el comportamiento y la vida social de estos animales, de tal manera que la reducción en la disponibilidad de hábitat genera un estrés social importante.

El mono araña vive en pequeños subgrupos temporales de composición inestable y variable, los cuales forman grupos sociales o comunidades de entre 15-40 individuos que comparten la misma área, que puede comprender entre 30-200 ha (Ramos-Fernandez & Ayala-Orozco, 2003). Raramente todos los miembros de un grupo son observados en un mismo lugar, sino que distintos subgrupos de 1-20 individuos se dispersan y reagrupan varias veces al día, resultando en algunos individuos invirtiendo varios días a distancias de ≤ 2 km del grupo (Ramos-Fernández 2005; van Rossmalen & Klein, 1987); debido a este comportamiento, los grupos de monos araña suelen tener un ámbito de distribución más amplio que los aulladores. Este tipo de organización social se conoce como fisión/fusión, y es similar a la que presentan los chimpancés (*Pan troglodytes*) (Lehmann & Boesch, 2004).

Las subunidades sociales pueden formarse únicamente de machos adultos, únicamente de hembras adultas, y juveniles; hembras adultas, juveniles e infantes; hembras adultas e infantes; y subunidades de un solo animal (Izawa, 1979). No obstante, se han observado distintos patrones de asociación: los machos tienden a asociarse más a menudo y por periodos más largos que las hembras, y dentro de cada sexo hay asociaciones de distinta intensidad (Chapman, 1990).

Los monos araña se comunican a través de una compleja comunicación vocal, compuesta por distintos tipos de “llamadas” y sonidos; de entre los cuales el mejor estudiado es el *whinny*. Se considera que esta vocalización es un tipo de señal empleada usualmente para comunicarse a través de distancias largas. Aunque no está claro cuál pueda ser su significado concreto, se le asocia con la coordinación de movimientos, localización de subgrupos o individuos, el reconocimiento de la identidad individual, además de jugar un rol en el mantenimiento de la coherencia espacial de la unidad social (Teixidor & Byrne, 1999; Ramos-Fernández 2005).

Las tres especies de primates que habitan en México tienen un papel primordial como dispersores primarios de semillas en los hábitats que habitan (Andresen 2002; Chapman & Onderdonk 1998; Lambert & Garber 1998), y además producen gran cantidad de heces que son utilizadas por la comunidad de escarabajos coprófagos (endozoocoria). De este modo, mediante la producción de heces, estos monos también juegan un papel significativo en el mantenimiento de las comunidades de estos insectos, y consecuentemente, en las numerosas funciones ecológicas que estos desempeñan (Ponce-Santizo *et al.*, 2006). En conjunto, estos primates tienen un papel crucial dentro de las redes tróficas y sin su participación en los diversos enlaces y procesos ecológicos de las selvas, se perdería gran parte de la capacidad de autorregulación y autorrecuperación de estos ecosistemas (Estrada *et al.*, 2006; Laurance 2003).

1.3 La perturbación del hábitat y sus efectos sobre los primates mexicanos

Debido a que la distribución geográfica de los primates silvestres en México está asociada a la de las selvas, la desaparición y fragmentación de estos ecosistemas ha resultado en la desaparición local o regional de las poblaciones de las tres especies de primates (Estrada & Coates-Estrada, 1988, 1996). En la actualidad su distribución se ha reducido en

un 80% y las poblaciones remanentes existen, como las selvas, en condiciones fragmentadas y de aislamiento (Cuarón 2008).

Además de que las poblaciones de primates mexicanos están disminuyendo debido a la deforestación, también se suman otras amenazas como la captura ilegal, ya sea para ser utilizados como alimento, o tráfico de ejemplares vivos para ser comercializados como mascotas (Estrada *et al.*, 2006; Kinzey 1997; Marsh *et al.*, 2008; Rivera & Calme, 2006; Rodríguez-Luna *et al.*, 2006; Van Belle & Estrada, 2006). Asimismo, algunas de sus poblaciones se han reducido debido a epidemias periódicas de fiebre amarilla (Reid, 1997). Como consecuencia, se estima que su población decline a un 60% en un periodo de tres generaciones, es decir aproximadamente 30 años (Marsh *et al.*, 2008).

De esta manera, según la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) estas especies, excepto *Alouatta palliata*, pertenecen al Apéndice 1, que corresponde a especies en peligro de extinción (CITES, 2009). Asimismo, la NOM-059-SEMARNAT-2001 y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Cuarón *et al.*, 2008) las consideran especies amenazadas.

1.4 Consecuencias de la variación en la disponibilidad de alimento asociada a la perturbación antropogénica

La pérdida, transformación y fragmentación del hábitat produce cambios, en muchos casos irreversibles, tanto en la disponibilidad de espacio como en la de alimento para las poblaciones de primates (Cowlshaw & Dunbar, 2000). La disponibilidad de alimento está supeditada tanto al grado de perturbación del hábitat, como al grado de competencia entre conespecíficos y con otras especies ecológicamente similares (Chapman *et al.*, 2006).

La insuficiencia de alimento está directamente relacionada con la reducción del tamaño de las poblaciones de primates en ambientes alterados (Estrada & Coates-Estrada, 1996). Al mismo tiempo, la

escasez de frutos está relacionada con la disminución de la biodiversidad (Kay *et al.*, 1997; Stevenson, 2001), densidad de población (Rode *et al.*, 2006; Worman & Chapman, 2006) pérdida de diversidad conductual (Rangel-Negrín *et al.*, 2016) y condición física de los individuos (Olupot, 2000).

La baja disponibilidad prolongada de recursos tróficos genera un entorno estresante que puede tener impactos directos sobre los primates, como son los cambios hormonales (Wasser *et al.*, 2000; Martínez-Mota *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2015), conductuales, de forrajeo y de interacción social (Sapolsky, 1992). Asimismo, estas perturbaciones prolongadas pueden conllevar a un cambio en la utilización de recursos intra e interespecífica.

1.4.1 Estrés fisiológico

La disponibilidad de alimento es un importante factor de estrés en primates que viven en hábitats perturbados. El estrés es la consecuencia fisiológica y conductual de los individuos al estar expuestos a una serie de eventos ambientales adversos que los amenazan (McEwen & Wingfield 2003). Un factor estresante es aquel que interrumpe la estabilidad del sistema fisiológico y puede ser de tipo psicológico o físico (Wingfield *et al.*, 1997; McEwen 2000). Este estímulo provoca respuestas fisiológicas que ayudan a los individuos a lidiar con el factor estresante. En particular, el organismo experimenta una serie de cambios endocrinos (secreción hormonal) cuyo efecto es el aumento de la disponibilidad inmediata de energía (Romero 2004) para facilitar respuestas fisiológicas y conductuales para afrontar a los retos ambientales (Cavigelli, 1999; Creel 2001). Después de percibir el factor estresante, comienza un incremento en la actividad del eje hipotálamo-pituitaria-adrenales, seguido de la liberación de glucocorticoides (cortisol, cortisona y corticosterona) en las glándulas suprarrenales, que es el paso final de la cascada hormonal que da inicio en el cerebro (Kimura *et al.*, 2000; De Vries 2002). Los glucocorticoides secretados promueven la glucogénesis y la liberación de glucosa al torrente

sanguíneo que permite la obtención de energía en el organismo (Korte 2001; Sapolsky 2002).

En condiciones normales, los glucocorticoides regresan a su nivel basal después de alcanzar un pico, aunque el factor estresante aún persista (Romero 2004). Sin embargo, si la fuente de estrés es crónica, los niveles de glucocorticoides tienden a permanecer por encima de los niveles basales, lo cual puede tener efectos negativos para la salud, como miopatía, hipertensión, inmunodepresión, pérdida de proteínas, muerte de células neuronales o supresión del crecimiento, entre otras (Sapolsky 1990; Wingfield *et al.*, 1997; Nelson 2000; DeVries 2002).

Cuadro 1.1 *Rutas hormonales e interacciones entre ellas*

El papel del sistema endocrino en la modulación de la respuesta fisiológica de estrés es ampliamente conocido, así como las bases neuroendocrinas por las cuales la respuesta al estrés prolongado puede afectar la fisiología reproductiva en vertebrados. El eje HHA (Hipotalámico-Hipofisario-Adrenal; en peces: Hipotálamo-Hipófisis-Interrenal) es el encargado de articular la respuesta a los factores estresantes, mientras que el HHG (Hipotalámico-Hipofisario-Gonadal) desempeña un papel fundamental en la regulación de varios sistemas del cuerpo, como los sistemas inmunitario y reproductivo.

El sistema nervioso autónomo interviene en ambos ejes. En el eje HHA, los estímulos del ambiente físico, social e interno se descifran a través del hipotálamo resultando en la liberación de Hormona liberadora de corticotropina (CRH). Este péptido regula la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la β -endorfina de la pituitaria anterior. También podría estar involucrada la liberación de hormona arginina vasopresina (AVP; AVT en tetrápodos no mamíferos) y oxitocina (mesotocina en tetrápodos no mamíferos).

La ACTH actúa en la corteza adrenal para la liberación de glucocorticoides (GC): corticosterona, cortisona y cortisol. El cortisol

tiene un grupo 17α -hidroxi adicional, que lo hace ligeramente más hidrofílico que la corticosterona. Las aves, los anfibios, los reptiles y algunos roedores (familia *Murinae* y conejos) secretan principalmente corticosterona, mientras que en los peces y en casi todos los demás mamíferos predomina la secreción de cortisol.

En el eje HHG los estímulos se interpretan a través del hipotálamo resultando en la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Este péptido regula la liberación de la hormona Luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH). Estas gonadotropinas regulan la función reproductiva en general, incluyendo la síntesis y liberación de las hormonas esteroideas sexuales: progesterona, estradiol, testosterona, entre otras.

Tanto las hormonas sexuales, como los GC secretados por estos ejes y que circulan en el plasma, son metabolizados principalmente por el hígado, aunque muchos otros órganos contribuyen al proceso (Taylor 1971). Los metabolitos resultantes se excretan a través de la bilis o la orina predominantemente como conjugados (Fig. 1.4). En el intestino puede producirse un mayor metabolismo de los esteroides excretados a través de la bilis por enzimas bacterianas, y los metabolitos también pueden reabsorberse parcialmente (circulación enterohepática). Los metabolitos de estas hormonas aparecerán en las heces a una latencia variable, que es específica de la especie y corresponde aproximadamente al tiempo de paso intestinal (Palme *et al.*, 1996).

Las ventajas y desventajas de utilizar diferentes materiales de muestra (sangre, saliva, leche, pelo, plumas y huevos) para evaluar la actividad adrenocortical se pueden revisar a detalle en literatura especializada (e.g., Mormede *et al.*, 2007; Hodges *et al.*, 2010; Sheriff *et al.*, 2011; Palme 2012; Burnard *et al.*, 2017; Spencer & Deak 2017). El presente trabajo se centra únicamente en el uso de muestras fecales.

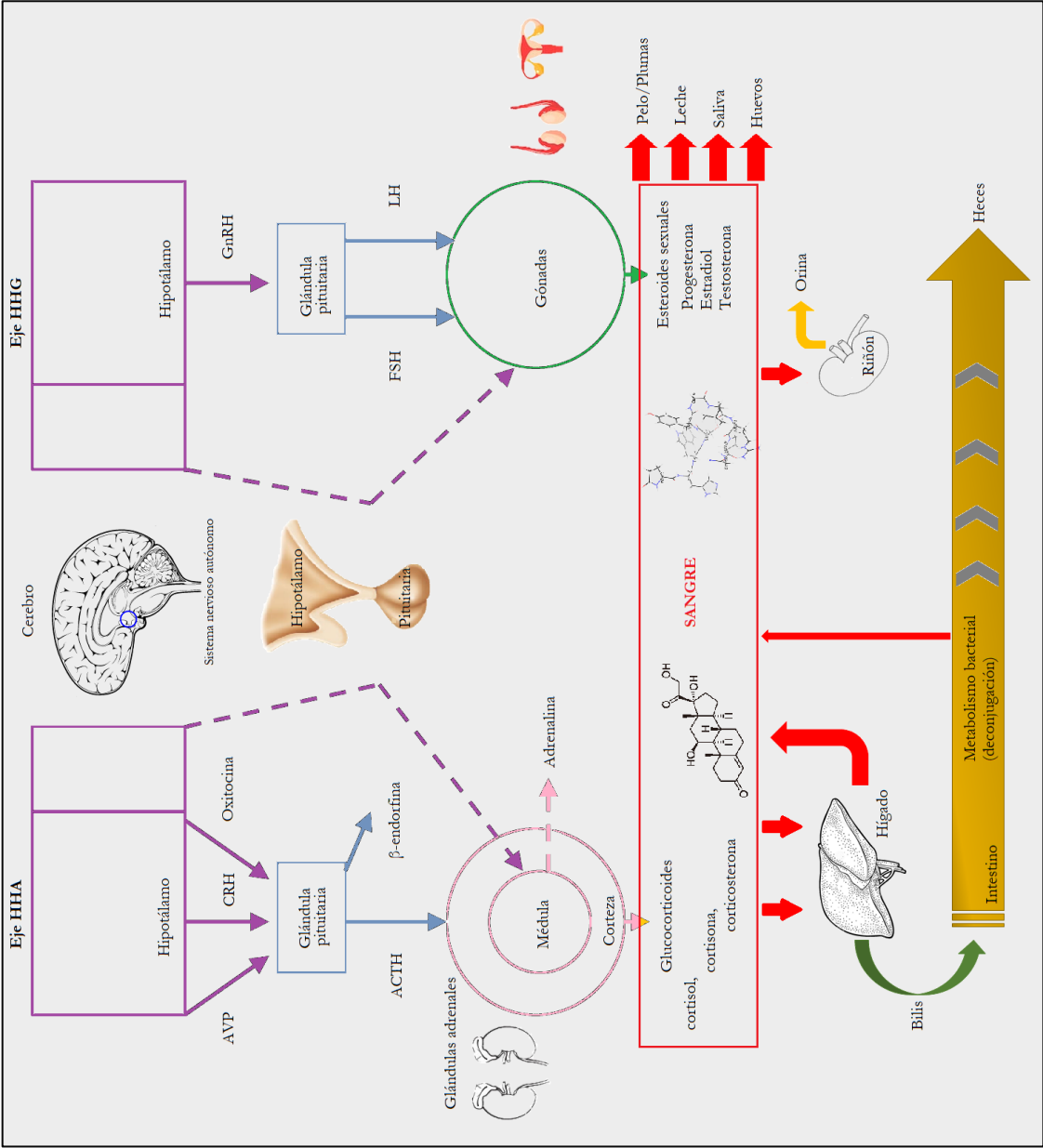


Figura 1.4 Rutas hormonales e interacciones entre ellas. Modificado de Wingfield & Sampolski (2003) y Palme (2019). Imágenes: De Basquetteur, sp.depositphotos.com

1.4.2 Alteraciones en el comportamiento reproductivo

El estrés crónico, provocado por la escasez prolongada de alimento, también puede afectar a la reproducción. Frente a restricciones en nutrientes y energía, la supresión reproductiva puede suponer un ahorro energético clave (Wingfield & Sapolsky, 2003). En mamíferos hembras, los efectos supresivos del estrés sobre la fisiología reproductiva y el comportamiento femenino consiste en tres factores: 1) trastornos en la ovulación; 2) incapacidad de la madurez uterina necesaria para la implantación del óvulo fecundado; y 3) inhibición de los comportamientos proactivos y receptivos (Wingfield & Sapolsky, 2003).

La imposibilidad de la madurez uterina se origina de dos maneras: primero, el estrés está asociado al declive en los niveles de progesterona, que normalmente interviene en la preparación de la pared uterina para la implantación del óvulo durante la fase lútea, y segundo, porque la secreción de prolactina inducida por estrés antagoniza los efectos anabólicos de la progesterona en el útero (Negro-Vilar 1993). El resultado es una fase folicular extendida, haciendo todo el ciclo reproductivo más largo e irregular (Wingfield & Sapolsky, 2003).

En muchas especies, el estrés disminuye el comportamiento proactivo femenino, factor clave para incrementar la probabilidad de reproducción, así como el interés en el comportamiento proceptivo de los machos (Carter 1992a, 1992b). Esto probablemente refleje mecanismos centrales, como la activación de sistemas neuronales significativos en términos de ansiedad y vigilia durante el estrés (Wingfield & Sapolsky, 2003). Además, el estrógeno promueve conductas tanto proceptivas, como receptivas, ambas a través de mecanismos centrales, predominantemente en el hipotálamo ventromedial (implicado en conductas defensivas/agresivas), y sensibilizando receptores táctiles a la estimulación en los genitales y otras partes del cuerpo (Wingfield & Sapolsky, 2003).

En roedores, estos efectos oestrogénicos son un prerrequisito para la conducta sexual normal (Wingfield & Sapolsky, 2003). Aunque en primates esta relación es más débil, es demostrable. Así mismo, la

disminución en los niveles de estrógeno inducidas por el estrés también puede contribuir a la pérdida de la libido (Wingfield & Sapolsky, 2003).

Finalmente, existe cierta evidencia de supresión inducida por el estrés sobre la secreción de andrógenos suprarrenales que, en condiciones normales, mejoran los comportamientos proceptivos y receptivos en primates hembras (Wingfield & Sapolsky, 2003).

Por otro lado, también en mamíferos, el estrés interrumpe la fisiología reproductiva y el comportamiento en machos de las siguientes maneras: 1) inhibición de las hormonas del eje gonadal, 2) incapacidad de las funciones eréctiles, y 3) inhibición de los comportamientos proactivos y receptivos (Wingfield & Sapolsky, 2003).

Esto podría derivar en un declive en los niveles de testosterona en el transcurso de minutos a horas en respuesta a una variedad de estresores físicos y psicológicos (Wingfield & Sapolsky, 2003). Sorprendentemente, la disminución en los niveles de testosterona rara vez es suficiente para desencadenar efectos adversos significativos sobre la fertilidad masculina (Wingfield & Sapolsky, 2003).

Mucho más acusado es el deterioro inducido por el estrés de la función eréctil (Wingfield & Sapolsky, 2003). Esto se cimenta en la compleja interacción entre la activación simpática y parasimpática del sistema nervioso central; con el tono parasimpático como prerequisite para la erección en muchas especies, y la transición al tono simpático que media la eyaculación. Como consecuencia, el estrés puede bloquear la capacidad de erección, o puede causar eyaculación prematura (Avitsur & Yirmina 1999).

1.4.2.1 Evaluación de la concentración de hormonas esteroides por métodos no invasivos para medir estrés y actividad reproductiva en vida silvestre

Como se mencionó anteriormente, los esteroides sexuales, como la testosterona, estrógenos y progesterona, participan en la actividad reproductiva, mientras que los glucocorticoides sintetizados en la corteza suprarrenal, especialmente el cortisol y la corticosterona, están relacionados con la respuesta al estrés (Hill, 1980). Estas hormonas además de pasar en forma libre a la saliva, también pueden encontrarse

conjugadas en las heces, o hallarse como metabolitos en la orina de muchas especies (Moberg & Mench, 2000).

La evaluación de la concentración de hormonas esteroides ha permitido conocer el estadio hormonal reproductivo de animales silvestres, tanto en vida libre como en cautiverio (Graham, 2006; Romano & Valdéz, 2006). Así mismo, ha permitido conocer el nivel de estrés al que están expuestos los individuos ocasionado por alteraciones del hábitat, competencia con otros animales, enfermedades, entre otros (Moberg & Mench 2000; Romano & Valdéz 2006). El monitoreo no invasivo de hormonas esteroides, a partir de muestras fecales, posee muchas ventajas siendo la más obvia evitar el manejo de los especímenes, y así no introducir variables ligadas al estrés por sujeción o por anestesia (Wasser 2000; Ziegler & Wittwer 2005; Graham 2006; Romano & Valdéz, 2006).

De esta manera, en los últimos años, se ha generado un gran interés en medir la concentración de hormonas esteroides en heces de fauna silvestre (ej. Foley *et al.*, 2001; Hunt *et al.*, 2004; Keay *et al.*, 2006). En primates la investigación socio-endócrina (interacciones entre hormonas, comportamiento y ambiente social) también ha sido desarrollada para comprender los mecanismos fisiológicos (Martínez-Mota *et al.*, 2008; Paramastri *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2017), estrategias reproductivas, variación en el éxito reproductivo individual (Soto *et al.*, 2006; Van Belle *et al.*, 2009a, 2009b; Rangel-Negrín *et al.*, 2018), así como cuestiones evolutivas y ecológicas (Terao *et al.*, 1995; Ziegler *et al.*, 1995; Norcross & Newman, 1999; Morgan *et al.*, 2000; Martínez-Mota *et al.*, 2007; Van Belle & Estrada 2008)

1.4.2.2 Validación del método

Debido a diferencias entre especies en el metabolismo endócrino, las técnicas para el monitoreo no invasivo deben ser desarrolladas y validadas para cada especie por separado, ya que la ruta de excreción de las hormonas esteroides (urinarias o fecales) varía considerablemente entre las especies, así como entre esteroides, dentro de la misma especie (Martínez-Mota *et al.*, 2008). Otro desafío es que las hormonas

esteroides usualmente son metabolizadas previo a la eliminación del cuerpo y hay diferencias en el metabolismo de las hormonas según la especie (Wasser *et al.*, 2000).

De manera que, aunque los métodos no invasivos han tenido gran auge en los últimos años, ha sido difícil comparar resultados entre estudios, ya que existe una gran diversidad de técnicas y métodos con los cuales se ha venido trabajando en las diferentes áreas. Esto hace de vital importancia intentar unificar criterios de selección de métodos y técnicas con el fin de establecer en futuros trabajos una metodología común que haga comparable los unos con los otros (Soto *et al.*, 2006; Suzán 2006). La validación en el laboratorio de los métodos no invasivos es un elemento crucial para demostrar que una técnica determinada puede detectar cambios en la actividad endócrina, y que, por ende, provee resultados fidedignos (Touma & Palme, 2005).

1.4.2.3 Evaluación del estrés originado por la variación en la disponibilidad de alimento

Como ya se mencionó, en la naturaleza la disponibilidad de recursos alimenticios sigue patrones sumamente complejos. Dichos recursos cambian de calidad, distribución, densidad y tamaño. La interacción entre la disponibilidad espacial y temporal de los recursos establecerá la posibilidad de acaparar el alimento por parte de algunos individuos. Es decir, si existe riqueza de alimento distribuido homogéneamente se reduce la posibilidad de monopolizar los recursos, mientras que, si el alimento se encuentra en pequeñas cantidades, la concentración espacial y la distribución temporal de este, pueden permitir la monopolización (Mathy & Isbell 2001). Si esto ocurre, podría generarse competencia por recursos dentro de los grupos, tanto de manera directa a través de conductas agonísticas, o indirecta, mediante relaciones de dominancia (Mathy & Isbell 2001; Weir & Grant 2004). En primates, además de su efecto en las relaciones sociales entre los integrantes de un grupo, la competencia por el alimento supone un elemento estresante, como lo confirman las fluctuaciones en la secreción de glucocorticoides en

aquellos individuos que compiten por los alimentos (Gómez-Espinosa *et al.*, 2014; Palme 2019).

Por ejemplo, en sifacas de diadema (*Propithecus diadema*) se midieron las concentraciones de glucocorticoides fecales para entender cómo la disponibilidad de alimento, la ingesta nutricional y la perturbación del hábitat impactaban la fisiología (Tecot *et al.*, 2019); en el colobo rojo ugandés (*Piliocolobus tephrosceles*), se examinó cómo la disponibilidad de alimento y las infecciones por parásitos gastrointestinales influían los niveles de cortisol (Chapman *et al.*, 2006); mientras que Pride (2005) empleó la medición en la concentración de esta hormona para determinar el estrés provocado por la fluctuación en la disponibilidad de la fruta en grupos de diferentes tamaños en el lémur de cola anillada (*Lemur catta*). En monos azules (*Cercopithecus mitis*) la evaluación de glucocorticoides sirvió para investigar la relación entre el estrés energético estacional según la disponibilidad de los recursos y la estacionalidad reproductiva en hembras (Foerster *et al.*, 2012). Igualmente, las mediciones de glucocorticoides fecales se utilizaron para evaluar el estrés causado tanto por factores medioambientales (principalmente biomasa de la fruta) como por factores sociales en monos capuchinos machos de cara blanca (*Cebus capucinus*) cuya reproducción es moderadamente estacional (Schoof *et al.*, 2016).

Cuadro 1.2 Tipos de competencia y sus correlatos sociales

El consumo de recursos influye en una serie de parámetros que determinan el éxito reproductivo de los mamíferos. Concretamente en hembras, algunos de estos parámetros son: la edad del primer parto, el intervalo entre partos, el número total de nacimientos y la supervivencia de las crías (revisado en Lee, 1987). Se cree que la presencia de otros individuos aumenta la competencia por los recursos y propicia que los subordinados reduzcan la cantidad de alimento consumido (Alexander, 1974; van Schaik, 1983; Wrangham, 1980). Por lo tanto, parece paradójico que, en muchas especies de mamíferos, las hembras vivan en

grupos con vínculos fuertes y estables. Los primates son mamíferos particularmente adecuados para abordar cuestiones relacionadas con la sociabilización. La mayoría vive en grupos cohesionados, y muchos de estos están compuestos por múltiples hembras (Llorente 2019).

Wrangham (1980) planteó la hipótesis de que, en muchas especies de primates, las hembras viven en grupos porque los beneficios de la defensa cooperativa de los recursos contra otras hembras superan el costo de la competencia intragrupo. Wrangham distinguió entre especies "unidas por hembras", en las que el mayor beneficio de la competencia intergrupala contribuye a las relaciones diferenciadas entre las hembras dentro de los grupos, y las especies "no unidas por hembras", en las que la incapacidad o la falta de necesidad de los grupos para defender los recursos alimentarios no favorece la cooperación y diferenciación de las relaciones femeninas dentro de los grupos.

Un análisis más minucioso revela que existe más que una simple dicotomía en las relaciones de las hembras y la competencia dentro y entre grupos (van Schaik, 1989). La competencia por los recursos alimenticios generalmente se infiere de cualquiera de las siguientes cinco observaciones: (1) jerarquías de dominancia femenina dentro de los grupos; (2) agresión femenina entre grupos; (3) aumento del tamaño del ámbito hogareño con el aumento del tamaño del grupo; (4) mayor longitud de la distancia diaria de viaje con el aumento del tamaño del grupo; y (5) tasas reproductivas más bajas en grupos más grandes.

La *distancia diaria de viaje* mide la distancia que un grupo se mueve cada día a medida que los individuos de dicho grupo obtienen su alimento (Clutton-Brock & Harvey 1977; Dunbar 1988; Waser 1977). La agresión se considera una forma de interferencia o competencia (Miller, 1967), mientras que los ajustes del rango de comportamientos al tamaño del grupo, incluido el tamaño del ámbito hogareño y la distancia diaria de viaje, se cree que reflejan la competencia explotadora o de lucha (por ejemplo, van Schaik & van Noordwijk, 1988). Ambos pueden reflejar la competencia por los recursos limitantes.

El siguiente modelo, propuesto por Isbell (1991), plantea asociaciones hipotéticas entre la abundancia y distribución de recursos con los patrones de agresión por parte de las hembras y el rango de

conductas. La abundancia de alimento puede afectar si los grupos más grandes tendrán ámbitos hogareños más grandes y si los grupos de hembras serán agresivos con hembras de otros grupos. La distribución de alimentos puede afectar si los grupos más grandes tendrán una mayor distancia diaria de viaje y si las hembras serán agresivas con otras hembras dentro de sus grupos. Las especies mencionadas son aquellas para las cuales hay suficientes datos disponibles para incluirlas en el modelo.

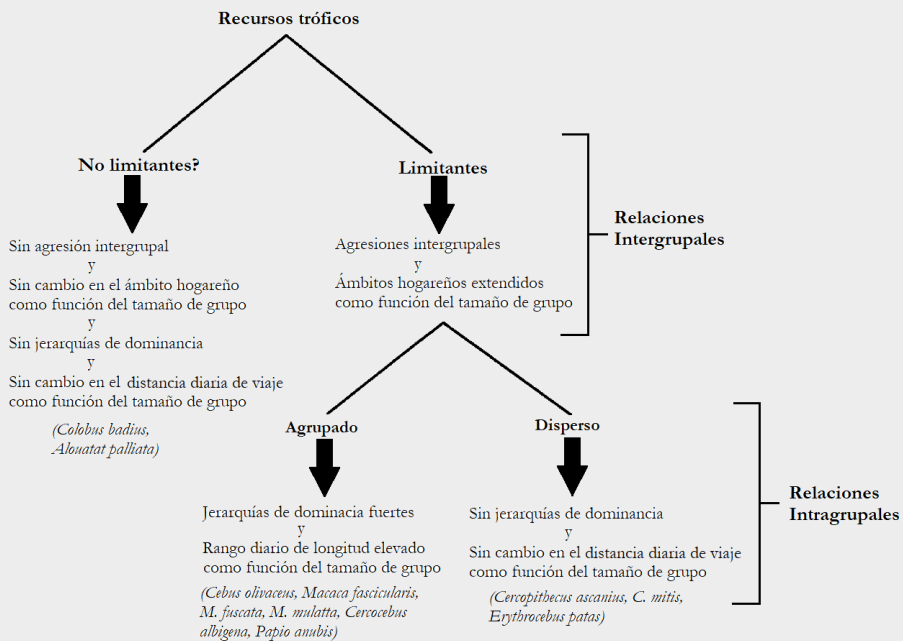


Figura 1.5 Tipos de competencia y sus correlatos sociales

Esta serie de estudios ha aprovechado la evaluación de la concentración de hormonas esteroides por métodos no invasivos para medir el estrés relacionado con los cambios en la disponibilidad de alimento, y en todos se ha encontrado una relación negativa entre las concentraciones de cortisol y la disponibilidad de alimento.

De manera que, cuando la variabilidad en la disponibilidad del alimento es restringida, se ve alterado el bienestar de los individuos

debido a la competencia por los recursos. Esto subraya la importancia de investigar qué aspectos concretos de esa disponibilidad afecta el comportamiento social y las respuestas fisiológicas de estrés en los individuos.

1.4.3 Segregación trófica en función de la disponibilidad de alimento

Otra consecuencia de la variabilidad en la disponibilidad de alimento a largo plazo sobre las especies es la que establece el principio de exclusión competitiva (Davies, *et al.*, 2012). Según este concepto, si dos especies están compitiendo por un mismo recurso limitado, una será tan eficiente como para utilizar o controlar el acceso a este recurso y finalmente eliminará a la otra en situaciones en las que aparezcan juntas (Gause 1934). De acuerdo con este principio, en las comunidades naturales sólo podrían hallarse especies disímiles coexistiendo. Cuando existe competencia, el grado de superposición de nichos entre las especies determina en gran medida la exclusión o coexistencia de estas (Davies, Krebs & West, 2012). La similitud de nicho entre las especies puede causar el mayor impacto en competidores inferiores a través de alteraciones de comportamiento (es decir, cambios en el uso del hábitat y nicho trófico) o exclusión y extinción de especies (Begon *et al.* 1996).

La exclusión competitiva puede evitarse si una o las dos especies en competencia evolucionan para usar un recurso diferente, ocupar un área distinta del hábitat o alimentarse a otra hora del día. El resultado de este tipo de evolución es que dos especies similares usan recursos que no se superponen y por lo tanto tienen nichos distintos. Esto puede derivar en una partición de recursos y ayuda a que las especies coexistan porque hay una menor competencia directa entre ellas (Schoener 1974; Bull 1991; Tokeshi 1999). Es decir que, cuando se encuentran coexistiendo especies similares, aunque parezca que los organismos comparten y disputan los mismos recursos, mediante un examen cuidadoso se puede demostrar que, en realidad, sus nichos son diferentes. En este sentido, algunas especies cuya simpatria ha sido observada, han desarrollado mecanismos de segregación ecológica,

permitiéndoles utilizar los recursos de tal manera que existen diferencias en la composición de las dietas (subnicho trófico) y otros parámetros de sus exigencias ecológicas (subnicho temporal y subnicho espacial; Koch 1974; Tilman 1982; Chesson 2000). En otras palabras, la diferenciación de nichos, en la cual las especies competidoras se especializan en distintos recursos (partición de recursos) o explotan los mismos recursos en diferentes lugares o tiempos (particiones de nicho espacial o temporal), favorece la coexistencia de especies.

Hoy en día los datos isotópicos se pueden analizar para conocer estos procesos ecológicos. El análisis de isótopos estables está asociado al resurgimiento del concepto de nicho en ecología, ya que un "nicho isotópico" puede considerarse como un componente de un nicho ecológico con dimensiones tanto bionómicas (dietéticas) como escenopoéticas (hábitat; Newsome *et al.*, 2007).

Cuadro 1.3 ¿Qué son los isótopos estables?

En la naturaleza muchos elementos existen en más de una forma estable. A estas formas se les llama isótopos. Los isótopos son variaciones de los elementos en cuyo núcleo tienen el mismo número de protones, pero diferente número de neutrones. Por ejemplo, el carbono existe en dos formas estables: la *ligera* ^{12}C tiene 6 protones y 6 neutrones en el núcleo y, por tanto, una masa atómica de 12; mientras que la forma *pesada* ^{13}C tiene 6 protones y 7 neutrones, con una masa atómica de 13 (Fig. 1.6).

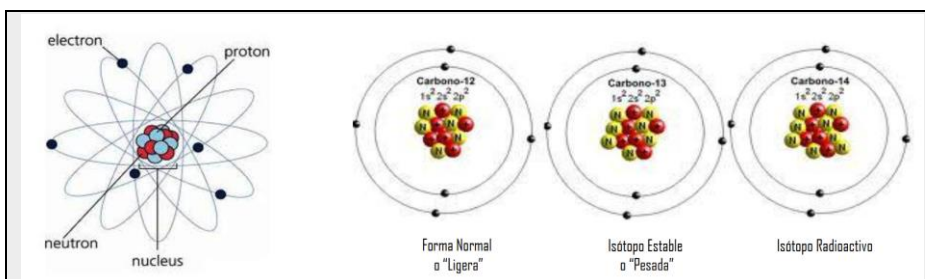


Figura 1.6 Composición de un átomo y formas ligeras, pesadas y radioactivas del elemento carbono. Modificado de: Fry, 2006.

La gran mayoría de los elementos de la tabla periódica poseen dos o más isótopos, incluyendo aquellos que constituyen la materia viva (carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, azufre, flúor, calcio y fósforo). En este trabajo únicamente nos referiremos a los isótopos estables de C y N. Así mismo, aunque las formas isotópicas inestables o radioactivas también existen, no serán objeto de estudio aquí.

Normalmente, las formas pesadas de los elementos son las menos abundantes en la naturaleza por la forma en la que son sintetizadas en las estrellas (Schoeninger 1995). Los isótopos se identifican con base en su masa, la cual varía en función del número de neutrones que tengan en el núcleo, ya que la suma de protones y neutrones es igual a la masa del isótopo. Los diferentes isótopos de un elemento comparten las mismas propiedades químicas porque las reacciones químicas están determinadas en gran medida por la configuración de los electrones. Sin embargo, las diferencias de masa entre los isótopos se traducen en diferencias en la velocidad de reacción. Por ejemplo, ^{12}C reacciona más rápido que ^{13}C . Los enlaces químicos de los isótopos "más ligeros" se rompen y se forman más rápidamente que los enlaces de los isótopos "más pesados" (por ejemplo, los enlaces ^{12}C - ^{14}N se rompen y se forman más rápidamente que los enlaces ^{12}C - ^{15}N). Estas diferencias en la tasa de reacción dan como resultado relaciones de isótopos en un producto que son diferentes de las de los componentes de partida o del sustrato de una reacción. Por ejemplo, el colágeno óseo es una proteína compuesta de aminoácidos individuales, cada uno de los cuales es un producto que

resulta de reacciones en un sustrato compuesto de alimentos y productos de degradación de las propias materias de un animal. La proporción $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de nitrógeno en el colágeno óseo (el producto) es diferente de la proporción en todo el nitrógeno en la dieta del animal y los productos de descomposición (el sustrato). El colágeno óseo normalmente tiene relativamente más ^{15}N que en la dieta porque se excreta relativamente más ^{14}N . Por lo tanto, el colágeno óseo está enriquecido en ^{15}N en relación con su sustrato, la dieta, mientras que los materiales de excreción se encuentran empobrecidos en ^{15}N . Si el producto se enriquece o se empobrece con respecto al isótopo más pesado, depende del conjunto particular de reacciones necesarias para su síntesis.

Por convención, la proporción de isótopos pesados a ligeros en cualquier muestra se expresa en relación a un estándar establecido internacionalmente para que los datos recopilados en todo el mundo sean comparables. La notación utilizada para describir dicha proporción es la siguiente:

$$\delta X = \frac{R_{\text{muestra}} - R_{\text{std}}}{R_{\text{std}}} \times 1000\text{‰}$$

donde δ (delta) es la notación isotópica, X es el elemento en su forma pesada (e.g., ^{13}C o ^{15}N), R_{muestra} es la proporción del isótopo pesado en relación al ligero en la muestra (e.g., $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$), R_{std} es el estándar reconocido internacionalmente, y las unidades de medida se presentan en partes por mil (‰). Los estándares internacionales para el carbono y el nitrógeno respectivamente son Vienna Peedee Belemnite (VPDB; $\delta^{13}\text{C}$), y el nitrógeno atmosférico (AIR; $\delta^{15}\text{N}$). Debido a que la existencia de algunas de estos estándares formales se ha agotado o son excesivamente caras, se utilizan otros materiales como estándares internos de laboratorio, que han sido previamente calibrados contra los originales (Sulzman 2007).

Debido a que la VPDB se deriva de una piedra caliza sedimentaria y contiene altas cantidades de ^{13}C , la mayoría de las muestras orgánicas se encuentran empobrecidas en relación con ella y,

por lo tanto, se expresan en números negativos. Los valores más negativos significan que hay menos átomos ^{13}C en la muestra (menor proporción = más empobrecida), valores menos negativos significan que hay más átomos ^{13}C (mayor proporción) y la muestra se considera menos empobrecida (Sulzman 2007). En el caso del nitrógeno sucede al revés: la mayoría de las muestras biológicas contienen relativamente más ^{15}N que el estándar, que es el nitrógeno atmosférico, formalmente denominado Depósito Ambiental Inhalable (AIR, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, la mayoría de las muestras biológicas tienen valores de nitrógeno positivos respecto a este estándar (Schoeninger 1995).

1.4.3.1 Isótopos estables en Ecología

La composición isotópica estable de los tejidos, excretas y aliento de los mamíferos se relaciona con la composición isotópica de los alimentos ingeridos y asimilados; concretamente, los isótopos estables de carbono y nitrógeno muestran patrones de enriquecimiento a nivel trófico (Ayliffe *et al.*, 2004; DeNiro & Epstein, 1978, 1981; Martínez del Río *et al.*, 2009; Minawaga & Wada, 1984; Sponheimer *et al.*, 2003). Por esta razón, el análisis de isótopos estables en Ecología se basa en el principio "somos lo que comemos", ya que las relaciones de isótopos estables de los alimentos se reflejan en los tejidos de sus consumidores, desvelando así, aspectos de la ecología, según el momento y la fuente de macronutrientes de la síntesis de tejidos (Passey *et al.*, 2005; Schoeninger, 1995; Tieszen *et al.*, 1983).

La principal fortaleza del análisis de isótopos estables es permitir conocer a un nivel más sutil las respuestas de los individuos a las condiciones ambientales (como el hábitat y la disponibilidad de alimentos, la competencia, la depredación y el riesgo de depredación) y, en última instancia, explorar cómo las respuestas de los individuos influyen en los componentes de la aptitud física (es decir, éxito reproductivo y supervivencia), dinámica poblacional emergente y

procesos de la comunidad y del ecosistema (Flaherty & Ben-David 2010).

1.4.3.2 Isótopos estables en Primatología

En las últimas décadas el uso del análisis de isótopos estables ha aumentado drásticamente, y ha resultado una importante herramienta en el estudio de ecología de mamíferos, incluido el ser humano (Ben-David & Flaherty 2012; Williams *et al.*, 2011; Codron *et al.*, 2013; Neuberger *et al.*, 2013; Tucker *et al.*, 2013, Voigt *et al.*, 2013). En primates, el análisis de isótopos estables ha proporcionado valiosa información sobre la variación dietética inter e intraespecífica (Codron *et al.*, 2006; Dammhahn & Kappeler, 2010, 2014; Loudon *et al.*, 2007; Loudon *et al.*, 2014; Oelze *et al.*, 2014; O'Regan *et al.*, 2008; Schoeninger *et al.*, 1997; Schoeninger *et al.*, 1998; Schurr, *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2010), cambios en la dieta a través del tiempo (Blumenthal *et al.*, 2012; Crowley *et al.*, 2012; 2014; Gibson, 2011), el consumo de proteína animal (Fahy *et al.*, 2013; Oelze *et al.*, 2011) e incluso la construcción de un paisaje isotópico para primates (Schoeninger 2010).

Los materiales más idóneos para estos análisis en primates son el cabello y las heces (Codron *et al.*, 2006, 2008; Oelze *et al.*, 2011; Schoeninger *et al.*, 1997; Sponheimer *et al.*, 2006), porque la recolección de muestras es mínimamente invasiva (Crowley 2012) y ambos reflejan de manera confiable la composición isotópica de los componentes de la dieta (Blumenthal *et al.*, 2012; Loudon *et al.*, 2007; Nakashita *et al.*, 2013). Por un lado, las heces reflejan una dieta integral integrada en unos pocos días (Blumenthal *et al.*, 2012; Codron *et al.*, 2006), posiblemente con un sesgo hacia alimentos menos digeribles (Codron *et al.*, 2011; Wittmer *et al.*, 2010). El cabello refleja las proporciones de isótopos de la dieta y los grupos endógenos generados a través del recambio de tejidos en el momento de la producción (Ayliffe *et al.*, 2004; West *et al.*, 2004), con un sesgo hacia el componente proteico de la dieta (Petzke, *et al.*, 2005; Wolf *et al.*, 2015). Estas propiedades han facilitado la investigación de cambios en la dieta a través del tiempo mediante el análisis en serie de segmentos de cabello (Oelze *et al.*, 2011); el muestreo repetido de heces

(Blumenthal *et al.*, 2012; Codron *et al.*, 2006; Phillips & O 'Connell, 2016); y la caracterización de la dieta durante períodos de tiempo más largos a través del análisis de muestras de cabello homogeneizadas (O'Regan *et al.*, 2008; Schoeninger *et al.*, 1997, 1999; Sponheimer *et al.*, 2006).

No obstante, a pesar de que los análisis de isótopos estables poseen un vasto potencial para el estudio ecológico y fisiológico de primates, el empleo de esta técnica en Platinos o primates del Nuevo Mundo, es prácticamente nulo, siendo representado por un solo estudio (Schoeninger *et al.*, 1997). Schoeninger *et al.* (1997) midieron las proporciones estables de isótopos de carbono y nitrógeno en el pelo de cuatro especies de monos del Nuevo Mundo: monos aulladores (*Alouatta palliata*), monos araña (*Ateles geoffroyi*), monos capuchinos (*Cebus capucinus*) y muriquis (*Brachyteles arachnoides*). Este fue el primer estudio que exploró la relación entre el hábitat y las diferencias dietéticas entre los primates modernos en hábitats dominados por plantas con ruta fotosintética C₃. En este estudio se encontró que cada taxón ocupa un área diferente del espacio de isótopos de carbono y nitrógeno, un resultado que corresponde a la variación en la cobertura del dosel para el carbono y la dieta para el nitrógeno.

Aunque la composición isotópica de carbono en las plantas C₃ generalmente se relaciona con el clima (Diefendorf *et al.*, 2010; Kohn, 2010; Szpak *et al.*, 2013), el segmento de la planta y la forma de crecimiento (Cernusak *et al.*, 2009; Martinelli *et al.*, 1998), en los bosques tropicales, el “efecto dosel” es un determinante principal de la variación isotópica. Este fenómeno se refiere a la estratificación vertical en la composición isotópica de carbono y nitrógeno de las hojas de las copas superiores de los árboles (Cuadro 1.4).

Cuadro 1.4 Efecto dosel

La copa de los árboles, denominado *dosel*, tiene tasas de recepción de luz y fotosíntesis más altas, de manera que las hojas superiores son más secas que las hojas de la parte inferior; asimismo existe una disminución del reciclaje de CO₂ absorbido por el suelo. Todo esto resulta en el aumento de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ en las hojas con una altura cada vez mayor sobre el suelo del bosque (Medina & Minchin 1980; van der Merwe & Medina 1989; Cerling *et al.*, 2004; Ehleringer *et al.*, 1987; Graham *et al.*, 2014; van der Merwe & Medina 1989; Voigt 2010).

Por otro lado, la proporción de isótopos de nitrógeno en las hojas del dosel son más altas que la corona inferior, debido a la pérdida preferencial de ^{14}N por volatilización en las hojas de la copa superior o por la captación diferencial de nitrógeno (NH₄) con valores de $\delta^{15}\text{N}$ más altos por parte de las hojas del dosel (Ometto *et al.*, 2006). A nivel regional, el aumento de la temperatura y la disminución de la lluvia se han relacionado con el aumento de $\delta^{15}\text{N}$ en las plantas C₃ (Handley *et al.* 1999; Swap *et al.* 2004).

Sin embargo, los valores de isótopos de nitrógeno en las plantas C₄ no parecen correlacionarse con las variables climáticas (Swap *et al.* 2004). Localmente, la humedad relativa, la profundidad de enraizamiento, las asociaciones micorrícicas; así como la humedad, química y edad del suelo, pueden afectar los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en las plantas C₃ (Handley *et al.* 1999; Marshall *et al.* 2007; Muzuka 1999). Los mecanismos detrás de estos patrones no están del todo claros. Sin embargo, es probable que estén relacionados con cambios en las fuentes de N (NO₃⁻, NH₄⁺, nitrógeno orgánico disuelto) que están disponibles para las plantas, así como la tasa de procesos como la nitrificación y la volatilización del amoníaco (Marshall *et al.* 2007; Muzuka 1999).

Esta variabilidad impulsada por el hábitat en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de la planta se refleja en los primates que los consumen. Como resultado, los primates que consumen plantas de hábitats calientes y secos exhiben valores de $\delta^{15}\text{N}$ más altos que los primates que consumen

plantas de hábitats frescos y húmedos (Crowley *et al.* 2011; Schoeninger *et al.* 1997). Por último, las plantas de localidades costeras y marinas tienden a tener valores de $\delta^{15}\text{N}$ muy altos (Muzuka 1999; Schoeninger & DeNiro 1984). Los primates que viven en localidades costeras que consumen nutrientes derivados del mar, por ejemplo, *Macaca fascicularis* que come cangrejos, podrían, por lo tanto, tener valores de $\delta^{15}\text{N}$ excepcionalmente altos.

1.4.3.3 Isótopos estables, segregación trófica y perturbación del hábitat

El análisis de isótopos estables también ha sido utilizado para investigar los efectos de la alteración antropogénica del hábitat y las interacciones con la presencia humana en las dietas de primates, explorar la dinámica de la partición de nichos entre los taxones simpátricos y probar las predicciones de la teoría ecológica (Sandberg *et al.*, 2012). Un estudio sobre la composición de isótopos estables en pelo de lémures de cola anillada en Madagascar demuestra la ventaja de combinar datos isotópicos con observaciones de campo a largo plazo para individuos y grupos sociales (Loudon *et al.*, 2007). En este estudio se encontró que un grupo que habitaba áreas de bosques vírgenes con un dosel cerrado tenía valores de $\delta^{13}\text{C}$ significativamente más bajos que grupos que utilizaban hábitats más abiertos y antropogenicamente modificados. El primer grupo también presentó valores más bajos de $\delta^{15}\text{N}$ que los otros grupos, y se alimentaba de más tamarindo (*Tamarindus indica*), una leguminosa fijadora de N.

También en Madagascar, Dammhahn & Kappeler (2014) utilizaron isótopos estables de carbono y nitrógeno en pelo para identificar la variabilidad inter e intraespecífica en la posición trófica de una comunidad rica en especies de lémures, y de esta manera responder a la pregunta de si los patrones tróficos y los mecanismos relacionados con el alimento estabilizan la coexistencia en la comunidad. Se encontró que las especies de lémures estaban separadas en nichos tróficos bien diferenciados y oscilaban en dos niveles tróficos. Además, las especies estaban densamente agrupadas en el espacio isotópico, lo que sugiere

que las interacciones competitivas entre las especies en el pasado son una fuerza de estructuración importante de la comunidad de lémures actual.

Estos mismos autores (Dammhahn & Kappeler 2010) ya habían medido las proporciones de isótopos de carbono y nitrógeno en pelo de dos especies simpátricas de lémur ratón (*Microcebus berthae* y *M. murinus*) y cuatro categorías de alimentos (frutas, gomas, secreciones de insectos y artrópodos) de Kirindy, un Bosque seco caducifolio en el oeste de Madagascar. En este estudio se halló que la variación estacional en los valores de ^{15}N para *M. berthae* y ^{13}C para *M. murinus*, estaban relacionados con las diferencias en el uso de recursos (y posiblemente con el periodo de letargo durante la estación seca), que juegan un papel en la diferenciación de nicho de estos taxones. Además, se interpretaron los datos de isótopos como evidencia de regímenes competitivos divergentes, que impulsan patrones contrastantes en el rango social de dominancia y el comportamiento social.

Loudon *et al.* (2014) buscaron entender, a través de los isótopos estables, cómo la presencia humana impacta los patrones dietarios de ocho grupos de monos verdes (*Chlorocebus pygerythrus*) en libertad. Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ fueron significativamente diferentes entre los grupos en función de la perturbación antropogénica. Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ fueron significativamente diferentes a nivel de grupo. Los dos grupos con mayor consumo de plantas con ruta fotosintética C_4 habitaban pequeñas reservas naturales, y parecían interactuar con los humanos solo de forma esporádica, y fueron situados inicialmente en el nivel medio de alteración antropogénica. Sin embargo, otras observaciones de comportamiento revelaron que los altos valores de $\delta^{13}\text{C}$ exhibidos por estos grupos estaban vinculados a una incursión nunca vista a cultivos de plantas C_4 .

Por otra parte, Oalze *et al.* (2014) analizaron la relación entre isótopos de carbono y nitrógeno de plantas y muestras de pelo, para comprobar si la segregación de nicho entre chimpancés y gorilas simpátricos es detectable mediante el análisis de isótopos en este material dividido en segmentos secuenciales, de manera que fue posible investigar la variación isotópica temporal relacionada con variaciones

estacionales del alimento. Estos autores encontraron diferencias significativas en el $\delta^{13}\text{C}$ entre plantas herbáceas y frutas, probablemente debido al efecto dosel (Van der Merwe & Medina 1991). Mientras que los valores $\delta^{13}\text{C}$ de los chimpancés indican el consumo de fruta, los valores bajos $\delta^{13}\text{C}$ en el pelo de gorila indican folivoría, muy probablemente a través del consumo de vegetación herbácea empobrecida en C^{13} . Los datos isotópicos también confirmaron la superposición de la dieta entre chimpancés y gorilas, que variaba según la temporada. Los gorilas mostraron una variación significativa en los valores $\delta^{13}\text{C}$ en respuesta a la estación climática debido a las proporciones inconstantes de plantas herbáceas frente a las frutas. En los chimpancés, la variación estacional significativa en el $\delta^{15}\text{N}$ se relacionó probablemente con la disponibilidad estacional de las especies frutales con valores $\delta^{15}\text{N}$ particularmente altos.

La variación de nichos tróficos en especies simpátricas también fue recientemente abordada por Sawyer *et al.* (2019). En este trabajo se examinó cómo coexisten sifacas de Verreaux (*Propithecus verreauxi*) y lémures de cola anillada (*Lemur catta*) dentro de un pequeño bosque considerando el uso de las plantas disponibles. Se midieron tanto los isótopos fecales de los individuos como del alimento que suelen consumir. El espacio isotópico de los lémures era grande, abarcando el espacio de los sifacas. El espacio de cada primate se superpuso con los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de las plantas que consumen y coincidió en gran medida con las observaciones. Los valores fecales de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ y el espacio isotópico para cada especie, revelaron diferencias significativas entre los grupos, el hábitat y las estaciones. Los datos también revelaron diferencias intragrupo que demuestran las fluctuaciones mensuales en la alimentación individual.

En definitiva, la evidencia isotópica de los patrones dietéticos a corto plazo puede resultar de gran valor para probar hipótesis ecológicas más detalladas sobre los primates, en particular los relacionados con la amplitud de la dieta, los niveles de especialización individual y el uso de recursos alternativos. Por otro lado, el concepto de nicho isotópico también ha contribuido a la biología de la conservación al proporcionar información sobre los cambios de nicho a través del tiempo, a menudo

en respuesta a las presiones de caza o la pérdida de hábitat por razones antropogénicas (Newsome *et al.*, 2007), de manera que puede ser una herramienta importante para los biólogos de conservación de primates.

1.5 Problema y justificación

Debido a las marcadas fluctuaciones en las cantidades de frutos, hojas y flores consumidos y al patrón de alimentación altamente selectivo asociadas a las perturbaciones medioambientales tanto naturales como antropogénicas (Milton 1980; Chapman 1988), las especies de primates estudiadas en este trabajo constituyen un modelo útil para examinar las relaciones entre las estrategias de forrajeo, patrones de comportamiento social y de utilización de hábitat.

Sin duda, la adquisición de un mayor conocimiento a diferentes escalas, en cuanto a las respuestas fisiológicas y la forma en que los primates mexicanos acceden a los alimentos frente a los cambios medioambientales, es fundamental para comprender los aspectos más básicos de su conducta y tiene implicaciones importantes para el estudio de la ecología y evolución de estos primates.

En el presente trabajo, se pretende, por un lado, validar analíticamente el método de extracción de cuatro hormonas esteroides (cortisol, progesterona, testosterona y estradiol); y de igual manera validar un método de determinación para cada una de estas hormonas en heces de *Alouatta pigra*. De igual manera, se corroborará cómo las funciones fisiológicas de las hormonas esteroides pueden determinarse mediante validaciones no farmacológicas y, por lo tanto, validarse fisiológicamente. La mayoría de los estudios que se han realizado sobre monos aulladores se han enfocado a la distribución y a registros de poblacionales silvestres. Ciertamente son necesarios más estudios sobre su fisiología en respuesta a la excesiva perturbación de su hábitat. Los parámetros endócrinos asociados al estrés y a los ciclos reproductivos establecidos para esta especie en el presente trabajo, permitirán un enfoque más preciso, así como también un manejo más correcto de las poblaciones en vida libre y establecer valores de referencia de vital

importancia para los programas de conservación de estos primates. Con base en los resultados obtenidos, se podrá mejorar el uso de esta técnica no invasiva para agilizar el monitoreo de rutina de hormonas, y la subsecuente obtención de información sobre esta especie en el marco de la variabilidad en la disponibilidad de alimento en su entorno.

En el contexto socio-ecológico de los primates no humanos, existen evidencias de que las relaciones sociales que se establecen entre individuos que pertenecen a un mismo grupo reflejan principalmente las características de los recursos tróficos que explotan (Chapman *et al.*, 2012). En particular, la distribución, tamaño y calidad del alimento parecen determinar el despliegue de diferentes tipos de relaciones sociales, de tal manera que, en términos muy generales, cuando el alimento se encuentra agregado, es escaso y de alta calidad existe una tendencia a que se establezcan relaciones sociales basadas en la capacidad individual de monopolizar el alimento; esto conduce al surgimiento de diferenciales de poder entre los miembros de un grupo, y a relaciones sociales autoritarias. En cambio, cuando el alimento se encuentra disperso, es abundante y de baja calidad, no existen diferencias en términos de monopolización entre los individuos, se espera que las relaciones sociales sean igualitarias (Gore 1993; Chapman *et al.* 1995; Isabel & Young 2002). No obstante, las respuestas conductuales de los individuos a la disponibilidad de alimento también dependerán de otros factores individuales (erg. sexo) y grupales, como el tamaño y composición sexo-edad del grupo al que pertenezcan (Stock *et al.* 1997; Smith & Chapman 2007). Paradójicamente, pocas veces estas premisas se testan en estudios donde se controlen dichas características de los recursos alimenticios. En el presente trabajo se aplicará el método de evaluación de la concentración de glucocorticoides por métodos no invasivos para medir cortisol, así como la relación en las interacciones sociales, en un grupo de monos araña en función de la variabilidad en la disponibilidad del alimento, mediante un experimento de dieta controlada. Este estudio pretende simular el impacto que tiene la variabilidad en la disponibilidad de alimento en los niveles de estrés de estos primates debido al impacto antropogénico en su hábitat.

Por otro lado, a pesar de que los análisis de isótopos estables poseen un vasto potencial para el estudio ecológico y fisiológico de primates, los trabajos en este grupo animal han sido relativamente escasos y las herramientas isotópicas continúan siendo un instrumento poco empleado. Es interesante señalar que para el caso de Platirrinos o primates del Nuevo Mundo, únicamente se han realizado dos estudios que reportan datos isotópicos recopilados en áreas de estudio conocidas (van der Merme & Medina 1991; Schoeninger 1997). De esta manera en el presente trabajo, a través de las herramientas isotópicas, se evaluará cómo influye el grado de perturbación medioambiental, y por ende la disponibilidad de alimento, en la segregación de nichos tróficos en diferentes poblaciones dos especies de monos aulladores, tanto en condiciones de simpatria, como de alopatria. En este sentido, la aplicación de este método ofrece un nuevo enfoque que será complementario a los estudios observacionales tradicionales realizados hasta el momento acerca de la ecología trófica de estos primates y de esta manera permitirá comprender mejor el impacto de las actividades humanas sobre sus poblaciones y detectar puntos clave para su conservación.

1.6 Objetivos

1.6.1 *Objetivos generales*

- Validar los métodos de determinación de hormonas esteroides presentes en heces de monos aulladores negros (*Alouatta pigra*).
- Abordar el impacto de la variación en la disponibilidad de los alimentos en la competencia alimentaria en monos araña negros (*Ateles geoffroyi*).
- Explorar la ecología trófica de dos especies de monos aulladores (*Alouatta pigra* y *A. palliata*) a través del análisis de isótopos estables.

1.6.2 *Objetivos particulares*

- Utilizar dos disolventes, etanol y metanol, para validar la técnica de extracción de testosterona, progesterona, estradiol y cortisol presentes en heces de mono aullador negro (*Alouatta pigra*).
- Validar fisiológicamente el método de determinación de testosterona, progesterona, estradiol y cortisol en heces de mono aullador negro (*Alouatta pigra*).
- Realizar la validación analítica el método de determinación de testosterona, progesterona, estradiol y cortisol en heces de mono aullador negro (*Alouatta pigra*), comparando los métodos de

Radioinmunoensayo e Inmunoensayo enzimático quimioluminiscente en fase sólida.

- Llevar a cabo un estudio experimental de manipulación en la disponibilidad de alimento en un grupo cautivo de monos araña negros (*Ateles geoffroyi*).
- Evaluar si la variación en la disponibilidad de alimento produce cambios en las interacciones sociales en el grupo.
- Medir la respuesta fisiológica al estrés producido por la variación en la disponibilidad de alimento a través de glucocorticoides fecales de los individuos.
- Investigar la variación en el nicho trófico de los monos aulladores de manto y negros (*Alouatta pigra* y *A. palliata*) entre las condiciones de alopatria y simpatria midiendo la amplitud de su nicho isotópico $\delta^{13}\text{C}$ x $\delta^{15}\text{N}$ y el grado de solapamiento de este en las distintas condiciones.

1.7 Descripción de la Tesis

El presente trabajo se enfoca a la revisión de técnicas no invasivas para comprender cómo las tres diferentes especies de primates más septentrionales (*Ateles geoffroyi*, *Alouatta pigra* y *A. palliata*) enfrentan los cambios en la disponibilidad de alimento en su hábitat, provocados por perturbaciones de origen antropogénico. Cada capítulo está organizado en torno a la teoría y aplicación de las principales herramientas no invasivas, bajo perspectivas fisiológicas, sociales y ecológicas, así como la integración de estudios de campo y laboratorio, subrayando la importancia de estos enfoques para la conservación de estos primates.

En el **Capítulo 1** presentado anteriormente, se introdujeron el marco teórico-conceptual de esta Tesis, la justificación y los objetivos.

En el **Capítulo 2** se abordan las razones por las cuales es necesario estandarizar las técnicas para evaluar la medición de metabolitos esteroides para cada especie en particular; y se detalla el tema de la validación analítica y métodos de determinación de hormonas esteroides concretamente en heces de mono aullador negro (*Alouatta pigra*). En este capítulo se comparan dos métodos de extracción utilizando dos disolventes distintos y se describen los costes y beneficios de dos técnicas ampliamente utilizadas para la evaluación de la concentración de hormonas en fauna silvestre: Radioinmunoensayo e Inmunoensayo enzimático quimioluminiscente en fase sólida. Así mismo se demuestra cómo las funciones fisiológicas de las hormonas esteroides se pueden determinar a través de validaciones no farmacológicas y, por lo tanto, validadas fisiológicamente.

El **Capítulo 3** aborda el impacto de la variación en la disponibilidad de alimento en la competencia trófica en *Ateles geoffroyi*. Esto se logró a través de un experimento con un grupo de monos araña en cautiverio al que se podía manipular la presentación del alimento y se midió la competencia trófica en respuesta a estos cambios mediante el registro de interacciones sociales, proximidad entre individuos y colecta de muestras fecales para la evaluación de metabolitos glucocorticoides, indicadores de estrés fisiológico.

En el **Capítulo 4** se examinó la amplitud del nicho isotópico, que es un proxy de la amplitud del nicho trófico, de distintas poblaciones de monos aulladores de manto (*Alouatta palliata*) y negros (*A. pigra*) habitando en alopatria y simpatria. También se calculó el área de solapamiento isotópico de las especies en cada condición. De esta manera, se evaluó si presentaban partición de nicho utilizando mediciones isotópicas en pelo, una técnica no invasiva que es capaz de revelar el grado de plasticidad trófica si la disponibilidad de alimento no es la óptima para que dos especies ecológicamente similares convivan. Este enfoque proporciona una visión invaluable de las implicaciones las actividades antropogénicas y su efecto en las poblaciones de primates.

Finalmente, en el **Capítulo 5** se discuten los principales resultados derivados de los tres capítulos principales que componen este trabajo, enfatizando la interacción entre la teoría, observaciones y sus implicaciones en la conservación de estos organismos. Asimismo, se incluyen recomendaciones para futuros estudios en el desarrollo de cada una de estas líneas de investigación. Por último, se presentan las conclusiones desprendidas de esta tesis doctoral.

1.8 Referencias

- Anaya-Huertas C & Mondragón-Ceballos (1998). Social behavior of black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*) reared as Home Pets. *International Journal of Primatology*, Vol. 19, No. 4.
- Andresen E (2002) Primary seed dispersal by red howler monkeys and the effect of defecation patterns on the fate of dispersed sedes. *Biotropica* 34: 261-272.
- Asensio N, Cristóbal-Azkarate J, Dias PAD, Veà-Baro JJ & Rodríguez-Luna E (2007). Foraging habits of *Alouatta palliata mexicana* in three forest fragments. *Folia primatol* 78: 141-153.
- Ayliffe LK, Cerling TE, Robinson T, West AG, Sponheimer M, Passey BH, Hammer J, Roeder B, Dearing MD & Ehleringer JR (2004). Turnover of carbon isotopes in tail hair and breath CO₂ of horses fed an isotopically varied diet. *Oecologia*, 139, 11– 22.
- Avitsur R & Yirmina R. (1999). The immunobiology of sexual behaviour: gender differences in the suppression of sexual activity during illness. *Pharmacol Biochem Behav*; 64:787-796.
- Begon M, Harper JL & Townsend CR (1996). Ecology: individual, population and communities. Blackwell Scientific Publications, London.
- Ben-David M & Flaherty EA (2012) Theoretical and analytical advances in mammalian isotope ecology: an introduction. *Journal of Mammalogy*, 93(2):309–311.
- Bicca-Marques JC (2003). How do howler monkeys cope with forest fragmentation? En: Marsh LK (ed.) *Primates in fragments: ecology and conservation*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. P. 283-303.
- Blumenthal SA, Chritzc KL, Rothmana JM & Cerling TE (2012). Detecting intraannual dietary variability in wild mountain gorillas by stable isotope analysis of feces. *Preceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (52) p. 21277-21282.
- Bolzinovic F, Calosi P & Spicer J (2011). Physiological correlates of geographic range in animals. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 42:155-179.

- Bull CM (1991). Ecology of parapatric distributions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22:19–36.
- Burnard C, Ralph C, Hynd P, Edwards JH & Tilbrook A (2017). Hair cortisol and its potential value as a physiological measure of stress response in human and nonhuman animals. *Anim. Prod. Sci.* 57 401–414.
- Carter S (1992a). Hormonal influences on human sexual behavior. En: Becker J, Breedlove S., Crews D, eds. *Behavioral Endocrinology*. Cambridge: MIT Press, 1992: 71-96.
- _____ (1992b). Hormonal influences on human sexual behaviour. En: Becker J, Breedlove S., Crews D, eds. *Behavioral Endocrinology*. Cambridge: MIT Press, 1992: 131-142.
- Cavigelli SA (1999) Behavioural patterns associated with faecal cortisol levels in free-ranging female ring-tailed lemurs, *Lemur catta*. *Animal Behaviour* 57: 935-944.
- Ceballos G & List R (2008). Manejo y conservación de fauna silvestre en paisajes dominados por actividades humanas en la región del Parque El Jaguarundi, Coatzacoalcas, Veracruz. p. 157-169, En: El Parque Jaguarundi: Conservación de la Selva Tropical Veracruzana en una zona industrializada. (Nava, Y. e I. Rosas, coords). Instituto Nacional de Ecología – Programa Universitario del Medio Ambiente Universidad Nacional Autónoma de México.
- _____ & Oliva G (eds) (2005). Los mamíferos silvestres de México. CONABIO-Fondo de Cultura Económica, México, D.F.
- Cernusak LA, Tcherkez G, Keitel C, Cornwell WK, Santiago LS, Knohl A, Barbour MM, Williams DG, Reich PB, Ellsworth DS, Dawson TE, Griffiths HG, Farquhar GD & Wright IJ (2009). Why are nonphotosynthetic tissues generally ^{13}C enriched compared with leaves in C_3 plants? Review and synthesis of current hypotheses. *Functional Plant Biology* 36:199–213
- Challenger A (1998). Utilización y conservación de los Ecosistemas Terrestres de México. Pasado, Presente y Futuro. CONABIO. IBUNAM. ASM. México 295 p.

- Chapman CA (1988). Patch use and patch depletion by the spider and howling monkeys of Santa Rosa National Park, Costa Rica. *Behaviour* 105:99–116.
- ____ (1990). Association patterns of spider monkeys: the influence of ecology and sex on social organization. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 26: 409–414.
- ____ & Balcomb SR (1998) Population characteristics of howlers: ecological conditions and group history. *International Journal of Primatology* 19(3): 385-403.
- ____ & Onderdonk DA (1998) Forest without primates: primate/plant codependency. *Am J Primatol* 45: 127-141.
- ____, Wasserman MD, Gillespie TR, Speirs ML, Lawes MJ, Saj TL & Ziegler TE (2006) Do food availability, parasitism, and stress have synergistic effects on red colobus populations living in forest fragments? *American Journal of Physical Anthropology*, 131(4): 525-534.
- Chesson P (2000) Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annu Rev Ecol Syst* 31:343–366
- Codron D, Codron J, Sponheimer M, Bernasconi SM & Clauss M (2011). When animals are not quite what they eat: Diet digestibility influences ¹³C-incorporation rates and apparent discrimination in a mixed-feeding herbivore. *Canadian Journal of Zoology*, 89, 453– 465.
- ____, Kirkman K, Duffy KJ, Sponheimer M, Lee-Thorp JA, Ganswindt A, Clauss M & Codron D (2013) Stable isotope turnover and variability in tail hairs of captive and free-ranging African elephants (*Loxodonta africana*) reveal dietary niche differences within populations. *Canadian Journal of Zoology* 91: 124–134.
- ____, Lee-Thorp JA, Sponheimer M, Ruiters D & Codron J (2008). What insights can baboon feeding ecology provide for early hominin niche differentiation? *International Journal of Primatology*, 29, 757– 772.
- ____, Lee-Thorp JA, Sponheimer M, Ruiters D & Codron J (2006). Inter- and intrahabitat dietary variability of chacma baboons (*Papio*

- ursinus*) in South African savannas based on fecal $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, and $\% \text{N}$. *American Journal of Physical Anthropology*, 129, 204–214.
- Cowlishaw G & Dunbar R (2000). Primate conservation biology. Chicago: University of Chicago Press.
- Creel S (2001) Social dominance and stress hormones. *Trends in Ecology and Evolution* 16:491-497.
- Cristobal-Azkarate J & Arroyo-Rodríguez V (2007) Diet and activity patterns of howler monkeys (*Alouatta palliata*) in Los Tuxtlas, Mexico: effects of hábitat fragmentation and implications for conservation. *Am J Primatol* 69:1-17.
- Crockett CM (1998) Conservation biology of the genus *Alouatta*. *Int J Primatol* 19: 549-578.
- _____ & Eisenberg JF (1987). Howlers: variations in group size and demography. En: Smuts BB, Cheney DL, Seyfarth RM, Wrangham RW, Struhsaker TT (eds.) Primate Societies. Chicago: University of Chicago Press: 54-68.
- Crowley BE (2012) Stable Isotope Techniques and Applications for Primatologists. *Int J Primatol* 33:673–701.
- _____, Carter ML, Karpanty SM, Zihlman AL, Koch PL & Dominy NJ (2010) Stable carbon and nitrogen isotope enrichment in primate tissues. *Oecologia* 164:611–626.
- _____, Rasoazanabary E & Godfrey LR (2014) Stable isotopes complement focal individual observations and confirm dietary variability in reddish-gray mouse lemurs (*Microcebus griseorufus*) from southwestern Madagascar. *American Journal of Physical Anthropology* 155(1): 77-90.
- _____, Thorén S, Rasoazanabary E, Vogel ER, Barrett MA, Zohdy S, Blanco MB, McGoogan KC, Arrigo-Nelson SJ, Irwin MT, Wright PC, Radespiel U, Godfrey LR, Koch PL & Dominy NJ (2011). Explaining geographical variation in the isotope composition of mouse lemurs (*Microcebus*). *Journal of Biogeography*, 38, 2106–2121.
- Cuarón AD, Shedden A, Rodríguez-Luna E, de Grammont PC & Link A (2008) *Alouatta palliata* ssp. *mexicana* y *Alouatta pigra*. En: IUCN 2008. 2008 IUCN red list of threatened species. www.redlist.org. Consultado el 13 de junio 2019.

- Dammhahn M & Kappeler PM (2010). Scramble or contest competition over food in solitarily foraging mouse lemurs (*Microcebus* spp.): New insights from stable isotopes. *American Journal of Physical Anthropology*, 141, 181– 189.
- _____ & Kappeler PM (2014). Stable isotope analyses reveal dense trophic species packing and clear niche differentiation in a Malagasy primate community. *American Journal of Physical Anthropology*, 153, 249– 259.
- DeNiro MJ & Epstein S (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42:495– 506.
- _____ & Epstein S (1981). Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 45:341–351.
- DeVries AC (2002) Interaction among social environment, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and behavior. *Hormones and Behaviour* 41: 405-413.
- Di Fiore A, Link A & Campbell CJ (2010) The atelines: behavioral and socioecological diversity in a New World radiation. En: Campbell CJ, Fuentes AF, MacKinnon KC, Bearder S, Stumpf R (eds) *Primates in perspective*, 2nd edn. Oxford University Press, New York. p 155–188.
- _____, Link A & Dew L (2008) Diets of wild spider monkeys. En: *Spider Monkeys: Behavior, Ecology and Evolution of the Genus Ateles*. Campbell C (Ed.) Cambridge University Press.
- Dias PAD, Coyohua-Fuentes A, Canales-Espinosa D, Chavira-Ramírez R & Rangel-Negrín A (2017) Hormonal correlates of energetic condition in mantled howler monkeys. *Hormones and Behavior*. Volume 94, August 2017, Pages 13-20.
- _____, Coyohua-Fuentes A, Canales-Espinosa D & Rangel-Negrín A (2015). The influence of stochastic events on the extinction risk of black howler monkey (*Alouatta pigra*) populations in Campeche, Mexico. *Neotropical Primates* 22:69–80.
- _____, Coyohua-Fuentes A, Canales-Espinosa D & Rangel-Negrín A (2016) Factors influencing the reproductive success of female black

- howler monkeys (*Alouatta pigra*). *International Journal of Primatology* 37:638–655.
- _____, Rangel-Negrín A, Coyohua-Fuentes A & Canales-Espinosa D (2014) Variation in Dietary Breadth Among Groups of Black Howler Monkeys is Not Associated with the Vegetation Attributes of Forest fragments. *Am. J. Primatol.* 76:1151–1162.
- Diefendorf AF, Mueller KE & Wing SL (2010). Global patterns in leaf ¹³C discrimination and implications for studies of past and future climate. *Proceedings of The National Academy of Sciences Of The United States Of America* 107: 5738–5743.
- Ellis EC, Klein Goldewijk K, Siebert S, Lightman D & Ramankutty N (2010) Anthropogenic transformation of the biomes, 1700–2000. *Global Ecol. Biogeogr* 19:589–606.
- Emmons LH & Feer F. (1990) Neotropical Rainforest Mammals: a field guide. University of Chicago Press. Chicago, Illinois.
- Estrada A & Coates-Estrada R (1988). Tropical rain forest conversion and perspectives in the conservation of wild primates (*Alouatta* and *Ateles*) in Mexico. *Am. J. Primatol.* 14: 315-327.
- _____, & Coates-Estrada R (1996) Tropical rain forest fragmentation and wild populations of primates at Los Tuxtlas. *Int. J. Primatol.* 5: 759-783.
- _____, Garber P, Pavelka M & Luecke L (2006) Overview of the Mesoamerican Primate Fauna, Primate Studies, and Conservation Concerns. En: A. Estrada, P. Garber, M. Pavelka and L. Luecke (eds), *New Perspectives in the Study of Mesoamerican Primates: Distribution, Ecology, Behavior and Conservation*, p. 1–22. Springer, New York, USA.
- _____, Juan-Solano S, Ortíz-Martínez T & Coates-Estrada R (1999) Feeding and general activity patterns of a howler monkey (*Alouatta palliata*) troop living in a forest fragment at Los Tuxtlas, Mexico. *Am J Primatol* 48: 167-183.
- Fahy GE, Richards M, Riedel J, Hublin J & Boesch C (2013). Stable isotope evidence of meat eating and hunting specialization in adult male chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 5829– 5833.

- Flaherty EA & Ben-David M (2010) Overlap and partitioning of the ecological and isotopic niches. *Oikos* 119:1409–1416.
- Foerster S, Cords, M & Monfort SL (2012) Seasonal Energetic Stress in a Tropical Forest Primate: Proximate Causes and Evolutionary Implications. *Plos ONE* 7(11). Número de artículo: e50108.
- Foley JA, DeFries R, Asner GP, Barford C, Bonan G, Carpenter SR, Chapin FS, Coe MT, Daily GC, Gibbs HK & Helkowski, JH (2005) Global consequences of land use. *Science* 309:570–574.
- Foley CAH, Papageorge S & Wasser SK (2001) Noninvasive stress and reproductive measures of social and ecological pressures in free-ranging African elephants. *Conservation Biology* 15:1134–1142.
- Fry B (2006). Stable isotope ecology (Vol. 521). New York: Springer.
- Gause GF (1934) The struggle for existence. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Gibson L (2011) Possible shift in macaque trophic level following a century of biodiversity loss in Singapore. *Primates*, 52, 217– 220.
- Gómez-Espinosa E, Rangel-Negrín A, Chavira R, Canales-Espinosa D & Dias PAD (2014). The effect of energetic and psychosocial stressors on glucocorticoids in mantled howler monkeys (*Alouatta palliata*). *American journal of primatology*, 76(4), 362–373.
- Graham LH (2006). Monitoring reproductive activity by determination of fecal and urinary steroid hormone metabolites. Memorias del Taller de Técnicas no invasivas para la evaluación del estado de salud y bienestar en animales silvestres. University of Guelph, Canada, DGZCM, UNAM. México.
- Handley LL, Austin AT, Stewart GR, Robinson D, Scrimgeour CM, Raven JA & Schmidt S (1999). The ^{15}N natural abundance ($\delta^{15}\text{N}$) of ecosystem samples reflects measures of water availability. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26, 185–199.
- Hodges K, Brown J & Heistermann M (2010) Endocrine monitoring of reproduction and stress. En: D.G. Kleiman, K.V. Thompson, C. Kirk Baer (Eds.), *Wild Mammals in Captivity: Principles and Techniques for Zoo Management*, University of Chicago Press, Chicago, p. 447–468.

- Horwich, RH & Johnson ED (1986) Geographical distribution of the black howler (*Alouatta pigra*) in Central America. *Primates* 27: 53-62.
- Hunt KE, Trites AW & Wasser SK. (2004). Validation of a fecal glucocorticoid assay for Stellar sea lions (*Eumetopias jubatus*). *Physiol. Behav.* 80: 595–601.
- Ibarra-Manríquez G, Ricker M, Angeles G, Sinaca-Colín S & Sinaca-Colín MA (1997) Useful plants of the Tuxtla rain forest (Veracruz, Mexico): considerations of their market potential. *Econ. Bot.* 51:362-376.
- Izawa K, Kimura K & Samper AN (1979) Grouping of the wild spider monkey. *Primates*, 20 (4): 503-512.
- Kay RF (1990) The phyletic relationships of extant and fossil Pitheciinae (Platyrrhini, Anthroproidea). *J Hum Evol* 19:175-208.
- Kamilar JM & Beaudrot L (2018) Effects of Environmental Stress on Primate Populations. *Annual Review of Anthropology* 47: 417-34.
- Keay JM, Singh J, Gaunt MS, & Kaur T (2006) Fecal Glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species: a literatura review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 37(3): 234–244.
- Kellog R & Goldman EA (1944) Review on the Spider Monkeys. *Proceedings of the U.S. National Museum*, 96:1-45.
- Kimura K, Shimizu K, Hayashi M, Ishikawa T & Ago Y (2000) Pituitary-adrenocortical responses to the first dyadic encounters in male Rhesus monkeys: effect of dominance relationship. *American Journal of Primatology* 50: 247-256.
- Kinzev WG (1997) Ateles. En: Kinzev WG (Ed.) New world primates: ecology, evolution and behavior. Aldine de Gruyter, New York, p 192–199.
- Koch AL (1974) Competitive coexistence of two predators utilizing the same prey under constant environmental conditions. *J Theor Biol* 44:387–395.
- Kohn MJ (2010) Carbon isotope compositions of terrestrial C₃ plants as indicators of (paleo) ecology and (paleo) climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:19691–19695.

- Konstant & Mittermeier AR (1985) Primates Conservation. The Newsletter and Journal of the IUCN/SSC. Primates Specialist Group. No. 5.
- Korte SM (2001) Cortocosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25:117-142.
- Kowalewski MM, Garber PA, Cortés-Ortiz L, Urbani B & Youlatos D (Eds.). (2015). Howler monkeys: behavior, ecology, and conservation. Springer.
- Lambert JE & Garber PE (1998) Evolutionary and ecological implications of primate seed dispersal. *Am. J Primatol* 45: 9-28.
- Laurance WF (2003) Forward: Primates as icons for conservation. En: Marsh LK (Ed.) Primates in fragments: ecology and conservation. New York: Kluwer Academy/Plenum Publishers. p. XI-XII.
- Leakey R & Lewin R (1998) La Sexta Extinción: El futuro de la vida y de la humanidad. Metatemas 50. Libros para pensar la Ciencia. Tusquets Editores. Barcelona, España. p. 296.
- Llorente M (2019) Primates. Biología, comportamiento y evolución. Lynx Edicions. Barcelona.
- Loudon JE, Grobler JP, Sponheimer M, Moyer K, Lorenz JG & Turner TR (2014). Using the stable carbon and nitrogen isotope compositions of vervet monkeys (*Chlorocebus pygerythrus*) to examine questions in ethnoprimateology. *PLoS One*, 9, e100758.
- _____, Sponheimer M, Sauter ML & Cuzzo FP (2007). Intraspecific variation in hair $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of ring-tailed lemurs (*Lemur catta*) with known individual histories, behavior, and feeding ecology. *American Journal of Physical Anthropology*, 133, 978– 985.
- Marsh LK, Cuarón AD, Cortés-Ortiz L, Shedden A, Rodríguez-Luna E & Grammont PC (2008). *Alouatta pigra*. En: IUCN 2018. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 04 October 2018.
- Marshall JD, Brooks JR & Lajtha K (2007). Sources of variation in the stable isotopic composition of plants. En R. Michener & K. Lajtha (Eds.) Stable isotopes in ecology and environmental science (2nd ed., p. 22–60). Boston: Blackwell.

- Martinelli L, Almeida S, Brown I, Moreira MZ, Victoria RL, Sternberg LSL, Ferreira CAC & Thomas WW (1998). Stable carbon isotope ratio of tree leaves, boles and fine litter in a tropical forest in Rondonia, Brazil. *Oecologia* 114:170–179
- Martínez del Río C, Wolf N, Carleton SA & Gannes LZ (2009) Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biological Reviews* 84:91–111.
- Martínez-Mota R, Valdespino C, Sánchez-Ramos MA & Serio-Silva JC. (2007) Effects of forest fragmentation on the physiological stress response of black howler monkeys. *Anim. Conserv.* 10:374–379
- _____, Valdespino C, Rivera Revollo JA & Palme R. (2008) Determination of fecal glucocorticoid metabolites to evaluate stress response in *Alouatta pigra*. *Int. J. Primatol.* 29:1365–1373.
- Mathy JW & Isbell LA (2001). The relative importance of size of food and interfood distance in eliciting aggression in captive rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Folia Primatologica* 72: 268–277.
- McEwen (2000) Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology* 22:108–124.
- _____, & Wingfield JC (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behaviour* 43:2–15.
- Medeiros MA, Barros RM, Pieczarka JC, Nagamachi CY, Ponsa M, Garcia M, Garcia F & Egozcúe J (1997) Radiation and speciation of spider monkeys, Genus *Ateles*, from cytogenetic viewpoint. *American Journal of Primatology* 42: 167–178.
- Medina E & Minchin P (1980). Stratification of $\delta^{13}\text{C}$ values of leaves in Amazonian rain forests. *Oecologia* 45:377–378.
- Milton K (1980) The foraging strategy of howler monkeys: a study in primate economics. Columbia University, New York.
- Milton K (1998) Physiological ecology of howlers (*Alouatta*): energetic and digestive considerations and comparison with the Colobinae. *Int J Primatol* 19:513–548.
- _____, & McBee RH (1983) Rates of fermentive digestion in the howler monkey, *Alouatta palliata* (Primates: Ceboidea). *Comp Biochem Physiol* 74: 29–31.

- Minawaga M & Wada E (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between ^{15}N and animal age. *Geochim Cosmochim Acta* 48:1135–1140.
- Mittermeier RA, Myers N, Thomsen JB, da Fonseca GAB & Olivieri S (1998). Biodiversity Hotspots and Major Tropical Wilderness Areas: Approaches to Setting Conservation Priorities. *Conservation Biology*, 12(3), 516–520.
- , Rylands AB & Wilson DE (eds.) (2013) Handbook of the Mammals of the world 3. PRIMATES. Lynx Ediciones, Barcelona, España, 953p.
- Moberg GP & Mench JA (2000). The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. Wallingford, UK, New York, NY, USA.
- Morgan D, Grant KA, Prioleau OA, Nader SH, Kaplan JR & Nader MA (2000) Predictors of social status in *Cynomolgus* monkeys (*Macaca fascicularis*) after group formation. *American Journal of Primatology* 52: 115-131.
- Mormede P, Andanson S, Auperin B, Beerda B, Guemene D, Malmkvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, van Reenen CG, Richard S & Veissier I (2007). Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol. Behav.* 92: 317–339.
- Muzuka A (1999). Isotopic compositions of tropical East African flora and their potential as source indicators of organic matter in coastal marine sediments. *Journal of African Earth Sciences*, 28, 757– 766.
- Nakashita R, Hamada Y, Hirasaki E, Suzuki J & Oi T (2013). Characteristics of stable isotope signature of diet in tissues of captive Japanese macaques as revealed by controlled feeding. *Primates*, 54, 271– 281.
- Negro-Vilar A (1993) Stress and other environment factors affecting fertility in men and woman: overview. *Environ Health Persp* 101:59-64.
- Nelson RJ (2000) An Introduction of Behavioral Endocrinology. Sinauer Publications, USA.

- Neuberger FM, Jopp E, Graw M, Püschel K & Grupe G (2013) Signs of malnutrition and starvation—Reconstruction of nutritional life histories by serial isotopic analyses of hair. *Forensic Science International* 226: 22–32.
- Neville MK, Glander KE, Braza F & Rylands AB (1988) The howling monkeys, genus *Alouatta*. En: R. A. Mittermeier, A. B. Rylands, A. F. Coimbra-Filho & G. A. B. Fonseca (Eds.), *Ecology and behavior of neotropical primates* (Vol. 2, p. 349–453). Washington: World Wildlife Fund.
- Newsome SD, Martinez del Rio C, Bearhop S & Phillips DL. (2007) A niche for isotopic ecology. *Front Ecol Environ* 5:429– 436.
- Norcross JL & Newman JD (1999) Effects of separation and novelty on distress vocalizations and cortisol in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *American Journal of Primatology* 47: 209–222.
- O'Regan HJ, Chenery C, Lamb AL, Stevens RE, Rook L & Elton S (2008). Modern macaque dietary heterogeneity assessed using stable isotope analysis of hair and bone. *Journal of Human Evolution*, 55, 617– 626.
- Oelze, VM, Fuller BT, Richards MP, Fruth B, Surbeck M, Hublin J-J & Hohmann G (2011). Exploring the contribution and significance of animal protein in the diet of bonobos by stable isotope ratio analysis of hair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 9792– 9797.
- _____, Head JS, Robbins MM, Richards M & Boesch C (2014). Niche differentiation and dietary seasonality among sympatric gorillas and chimpanzees in Loango National Park (Gabon) revealed by stable isotope analysis. *Journal of Human Evolution*, 66, 95– 106.
- Olupot W (2000) Mass differences among male mangabey monkeys inhabiting logged and unlogged forest compartments. *Conserv Biol* 14:833–843.
- Ometto JPH, Ehleringer JR, Domingues T, Berry JA, Ishida FY, Mazzi E, Higuchi N, Flanagan L, Nardoto GB & Martinelli LA (2006). The stable carbon and nitrogen isotopic composition of vegetation

- in tropical forests of the Amazon Basin, Brazil. *Biogeochemistry* 79:251–274.
- Palme R (2012) Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Anim. Welf.* 21:331–337.
- Palme R (2019) Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiology & Behavior* 199 (2019) 229–243.
- Palme R, Fischer P, Schildorfer H & Ismail MN (1996) Excretion of infused ^{14}C -steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Anim. Reprod. Sci.* 43: 43–63.
- Paramastri Y, Royo F, Eberova J, Carlsson H, Sajuthi D, Fernstron A, Pamungkas J & Hau J (2007) Urinary and fecal immunoglobulin A, cortisol and 11-17 dioxoandrostanes, and serum cortisol metabolic cage housed female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Primatol.* 36:355–364.
- Passy BH, Robinson TF, Ayliffe LK, Cerling TE, Sponheimer M, Dearing DM, Roeder BL & Ehleringer JR (2005) Carbon isotope fractionation between diet, breathe CO_2 , and bioapatite in different mammals. *Journal of Archaeological Science* 32:1459–1470.
- Pavelka MSM, Brusselers OT, Nowak D & Behie AM (2003) Population reduction and social disorganization in *Alouatta pigra* following a hurricane. *International Journal of Primatology* 24(5): 1037–1055.
- Petzke KJ, Boeing H, Klaus S & Metges CC (2005). Carbon and nitrogen stable isotopic composition of hair protein and amino acids can be used as biomarkers for animal-derived dietary protein intake in humans. *The Journal of Nutrition*, 135, 1515–1520.
- Phillips CA & O'Connell TC (2016). Fecal carbon and nitrogen isotopic analysis as an indicator of diet in Kanyawara chimpanzees, Kibale National Park, Uganda. *American Journal of Physical Anthropology*, 161, 685–697.
- Ponce-Santizo G, Andersen E, Cano E & Cuarón AD (2006). Dispersión primaria de semillas por primates y dispersión

- secundaria por escarabajos coprófagos en Tikal, Guatemala. *Biotropica* 38:390–397.
- Pride E (2005) Optimal group size and seasonal stress in ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). *Behavioral Ecology* 16(3): 550-560.
- Ramos-Fernández G (2005) Vocal communication in a fission-fusion society: do spider monkeys stay in touch with close associates? *International Journal of Primatology* 26(5): 1077-1092.
- ____ & Anaya-Orozco B (2003) Population size and habitat use of spider monkeys in Punta Laguna, Mexico. En: Marsh L. K. (Ed) *Primates in Fragments: Ecology and Conservation*. Kluwer/Plenum Press, New York.
- Rangel-Negrín A, Coyohua-Fuentes A, Canales-Espinosa D, Chavira R & Dias PAD (2018) Maternal glucocorticoid levels affect sex allocation in black howler monkeys. *Journal of Zoology* 304(2): 124-131.
- ____, Coyohua-Fuentes A, Canales-Espinosa D & Dias PAD (2016) The loss of behavioral diversity as a consequence of anthropogenic habitat disturbance: the social interactions of black howler monkeys. *Primates* 57: 9.
- Reid FA (1997) *The mammals of Central America and Southeast Mexico*. Oxford University Press. EUA.
- Rivera A & Calmé S (2006) Forest fragmentation and its effects on the feeding ecology of black howlers (*Alouatta pigra*) from the Calakmul area in Mexico. En: Estrada A, Garber PA, Pavelka M, Luecke L. (Eds.). *New perspectives in the study of Mesoamerican primates. Distribution, ecology and conservation*. Springer, EUA.
- Rode KD, Chapman CA, McOwell LR & Stickler C (2006) Nutritional correlates of population density across habitats and logging intensities in redbellied monkeys (*Cercopithecus ascanius*). *Biotropica* 38:625-634.
- Rodríguez-Luna E, Solórzano-García B, Shedden A, Rangel-Negrín A, Dias PAD, Cristóbal-Azkárate J, Cortés-Ortiz L, Dunn JC, Domingo-Balcells C, Sánchez S, Carrillo L & Cornejo J (2006) Taller de conservación, análisis y manejo planificado para los

- primates mexicanos. Universidad Veracruzana/CBSG México. 81 p.
- Romano MC & Valdéz RA (2006) Determinación de esteroides por métodos no invasivos. Memorias del Taller de Técnicas no invasivas para la evaluación del estado de salud y bienestar en animales silvestres. Dpto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, DGZCM, UNAM. México
- Romero LM (2004) Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends in Ecology and Evolution* 19:249-255.
- Roosmalen MGM van & Klein LL (1987) The spider monkey, Genus *Ateles*. En: R.A. Mittermeir, A.B. Rylands, A. Coimbra-Filho y G.A.B. Fonseca (Eds). Ecology and behaviour of neotropical primates. Washington D.C: WWF.
- Rylands AB, Groves CP, Mittermeier RA, Cortés-Ortiz L & Hines JJH (2005) Taxonomy and Distributions of Mesoamerican Primates. En: New Perspectives in the Study of Mesoamerican Primates: Distribution, Ecology, Behavior, and Conservation, edited by Alejandro Estrada, Paul A. Garber, Mary S. M. Pavelka, and LeAndra Luecke. Springer, New York, 2005.
- _____ & Mittermeier RA (2009). The Diversity of the New World Primates (Platyrrhini): An Annotated Taxonomy. *Developments in Primatology: Progress and Prospects* 2: 23-54.
- Sandberg P, Loudon JE & Sponheimer M (2012) Stable Isotope Analysis in Primatology: A Critical Review. *Am J Prim* 74:969–989.
- Sapolsky RM (1990) Stress in the wild. *Scientific American* 256:106-113.
- _____ (1992) Cortisol concentrations and the social significance of rank instability among wild baboons. *Psychoneuroendocrino* 17(6):701-709.
- _____ (2002) Endocrinology of the stress response. En: Becker JB, Breedlove SM, Crews D and McCarthy MM (Eds.). p. 409-450. Behavioral Endocrinology. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- Sassi PL, Caviédes-Vidal E, Anton R & Bozinovic F (2010). Plasticity in food assimilation, retention time and coprophagy allow herbivorous cavies (*Microcavia australis*) to cope with low food quality in the

- Monte desert. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 155(3), 378-382.
- Sawyer NW, Loudon JE, Schacht R, Sauther ML & Sponheimer M (2019) Detecting shifts in the trophic niches of sympatric Verreaux's sifaka (*Propithecus verreauxi*) and ring-tailed lemurs (*Lemur catta*) using stable isotope analyses. Abstracts of the 88th Annual Meeting of the American Association of Physical Anthropologists.
- Schoener TW (1974) Resource partitioning in ecological communities. *Science* 185:27-39.
- Schoeninger MJ (1995) Stable Isotope Studies in Human Evolution. Evolutionary Anthropology. Wiley-Liss, Inc.
- _____ (2010). Toward a $\delta^{13}\text{C}$ isoscape for primates. En: Isoscapes (p. 319-333). Springer, Dordrecht.
- _____ & DeNiro MJ (1984). Nitrogen and carbon isotopic composition of bone collagen from marine and terrestrial animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48: 625-639.
- _____, Iwaniec UT & Glander KE (1997) Stable isotope ratios indicate diet and habitat use in New World Monkeys. *Am J Phys Anthropol* 103:69-83.
- _____, Iwaniec UT & Nash LT (1998) Ecological attributes recorded in stable isotope ratios of arboreal prosimian hair. *Oecologia* 113:222-230.
- Schoof VAM, Bonnell TR, Jack KM, Ziegler TE, Melin AD & Fedigan LM (2016) Male endocrine response to seasonally varying environmental and social factors in a neotropical primate, *Cebus capucinus*. *Am J Phys Anthropol* 159(4): 671-682.
- Schurr MR, Fuentes A, Luecke E, Cortes J & Shaw E (2012). Intergroup variation in stable isotope ratios reflects anthropogenic impact on the Barbary macaques (*Macaca sylvanus*) of Gibraltar. *Primates*, 53, 31- 40.
- Sheriff MJ, Dantzer B, Delehanty B, Palme R & Boonstra R (2011) Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 166: 869-887.

- Silver SC, Ostro LET, Yeager CP & Horwich R. (1998) Feeding ecology of the black howler monkey (*Alouatta pigra*) in Northern Belize. *Am. J. Primatol.* 45: 263–279.
- Smith, JD (1970) The systematic status of the black howler monkey, *Alouatta pigra* Lawrence. *J. Mammal.* 51: 358- 369.
- Smith CC, Morgan ME & Pilbeam D (2010). Isotopic ecology and dietary profiles of Liberian chimpanzees. *Journal of Human Evolution*, 58, 43–55.
- Spencer RL & Deak T (2017) A users guide to HPA axis research. *Physiol. Behav.* 178: 43–65.
- Sponheimer M, Loudon JE, Codron D, Howells ME, Pruett JD, Codron J, de Ruiter DJ & Lee-Thorp JA (2006). Do “savanna” chimpanzees consume C₄ resources? *Journal of Human Evolution*, 51, 128–133.
- _____, Robinson TF, Ayliffe LK, Passey B, Roeder B, Shipley L, Lopez E, Cerling T, Dearing D & Ehleringer J (2003) An experimental study of carbon-isotope fractionation between diet, hair, and feces of mammalian herbivores. *Canadian Journal of Zoology* 81:871–876.
- SSA (Secretaría de Salud) (1996). Métodos analíticos: Validación. México.
- Soto MS, Olivera AC, Rivera RJA, Gual SF, Yáñez MI, Rangel RI & Pintado EA (2006). EIA de lo ideal o lo real. Experiencias en el Laboratorio de reproducción “MVZ Juan Téllez Girón”. Memorias del Taller de Técnicas no invasivas para la evaluación del estado de salud y bienestar en animales silvestres. Dirección General de Zoológicos de la Ciudad de México, UNAM. México.
- Stevenson PR (2001) The relationship between fruit production and primate abundance in Neotropical communities. *Biol J Linn Soc* 72:161-178.
- Sulzman EW (2007) Stable isotope chemistry and measurement: a primer. Stable isotopes in ecology and environmental science, 1 (R. Michener & K. Lajtha, eds.). 2nd ed. Blackwell Publishing, Boston, Massachusetts, p 1–21.

- Suzán AG (2006) Evaluación epidemiológica no-invasiva. Memorias del Taller de Técnicas no invasivas para la evaluación del estado de salud y bienestar en animales silvestres. DGZCM, UNAM. México.
- Swap RJ, Aranibar JN, Bowty PR, Gilhooly WP III & Macko SA (2004). Natural abundance of ^{13}C and ^{15}N in C_3 and C_4 vegetation of southern Africa: Patterns and implications. *Global Change Biology*, 10, 350–358.
- Szpak P, White CD, Longstaffe FJ, Millaire J-F & Sanchez VFV (2013). Carbon and nitrogen isotopic survey of northern peruvian plants: baselines for paleodietary and paleoecological studies. *PLoS ONE* 8:e53763
- Tecot SR, Irwin MT & Raharison JL (2019) Faecal glucocorticoid metabolite profiles in diademed sifakas increase during seasonal fruit scarcity with interactive effects of age/sex class and habitat degradation. *Conservation Physiology*, Volume 7.
- Teixidor P & Byrne RW (1999) The “whinny” of spider monkeys: individual recognition before situational meaning. *Behaviour* 136: 279-308.
- Terao K, Hamano M & Koyama T (1995) The repeated procedure of weaning and peer group formation causes accumulation of stress and changes of plasma cortisol level and natural killer activity in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Primates* 36: 121-127.
- Tieszen LL, Boutton T, Tesdahl K & Slade N (1983) Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia* 57:32–37.
- Tilman D (1982) Resource competition and community structure. Princeton University Press, NJ, USA.
- Tokeshi M (1999) Species coexistence: ecological and evolutionary perspectives. London: Blackwell Science.
- Touma C & Palme R (2005) Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of a biological validation. *Ann NY Acad Sci* 1046:54–74.
- Tucker S, Stenson GB, Bowen WD & Iverson SJ (2013) Fueling phocids: Divergent exploitation of primary energysources and

- parallel ontogenetic diet switches among three species of subarctic seals. *Marine Mammal Science*, 29(4): E428–E447.
- Taylor W (1971) The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces. *Vitam. Horm.* 29: 201–285.
- Van Belle SV & Estrada A (2006) Demographic features of *Alouatta pigra* populations in extensive and fragmented forests. En: Estrada A, Garber PA, Pavelka M, Luecke L. (Eds.). New perspectives in the study of Mesoamerican primates. Distribution, ecology and conservation. Springer, EUA.
- ____ & Estrada A (2008). Group size and composition influence male and female reproductive success in black howler monkeys (*Alouatta pigra*). *Am. J. Primatol.* 70:613–619.
- ____, Estrada A, Ziegler TE & Strier KB (2009a). Sexual behavior across ovarian cycles in wild black howler monkeys (*Alouatta pigra*): male mate guarding and female mate choice. *Am. J. Primatol.* 71: 153–164.
- ____, Estrada A, Ziegler TE & Strier KB (2009b). Social and hormonal mechanisms underlying male reproductive strategies in black howler monkeys (*Alouatta pigra*). *Horm. Behav.* 56: 355–363.
- van der Merwe NJ & Medina E (1989) Photosynthesis and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in Amazonian rain forests. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 53:1091–1094.
- ____, Medina E (1991) The canopy effect, Carbon Isotope Ratios and Foodwebs in Amazonia. *Journal of Archaeological Science* 18, 249–259.
- Voigt CC, Schneeberger K & Luckner A (2013) Ecological and dietary correlates of stable hydrogen isotope ratios in fur and body water of syntopic tropical bats. *Ecology*, 94(2), p. 346–355.
- Wasser SK, Hunt KE, Brown JL, Cooper K, Crockett CM, Bechert U, Millspaugh JJ, Larson S & Monfort SL (2000). A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120: 260–275.
- Weir LK & Grant JWA (2004). The causes of resource monopolization: interaction between resource dispersion and mode of competition. *Ethology* 110: 63–74.

- West AG, Ayliffe LK, Cerling TE, Robinson TF, Karren B, Dearing MD & Ehleringer JR (2004). Short-term diet changes revealed using stable carbon isotopes in horse tail-hair. *Functional Ecology*, 18, 616–624.
- Williams LJ, White CD & Longstaffe FJ (2011) Improving Stable Isotopic Interpretations Made From Human Hair Through Reduction of Growth Cycle Error. *American Journal of Physical Anthropology* 145:125–136.
- Wingfield JC, Hunt K, Breuner C, Dunlap K, Fowler GS, Freed L & Lepson J (1997) Environmental stress, field endocrinology and conservation biology. En; Clemmons JR and Buchholz R (Eds.). p. 95-131. Behavioral Approaches to Conservation in the Wild. Cambridge University Press, U.K.
- Wingfield JC & Sapolsky RM (2003) Reproduction and Resistance to Stress: When and How. *Journal of Neuroendocrinology* Vol. 15, 711-724.
- Wittmer MHOM, Auerswald K, Schönbach P, Schäufele R, Müller K, Yang H, Bai YF, Susenbeth A, Taube F & Schnyder, H. (2010). Do grazer hair and faeces reflect the carbon isotope composition of semi-arid C₃/C₄ grassland? *Basic and Applied Ecology*, 11, 83– 92.
- Wolf N, Newsome SD, Peters J & Fogel ML (2015). Variability in the routing of dietary proteins and lipids to consumer tissues influences tissue-specific isotopic discrimination. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29, 1448– 1456.
- Worman CO & Chapman CA. (2006) Densities of two frugivorous primates with respect to forest and fragment tree species composition and fruit availability. *Int J Primatol* 27:203-225.
- Ziegler T, Hodges K, Winkler P & Heistermann M (2000). Hormonal correlates of reproductive seasonality in wild female hanuman langurs (*Presbytis entellus*). *Am. J. Primatol.* 51: 119–134.
- _____, Scheffler G & Snowdon C (1995) The relationship of cortisol levels to social environment and reproductive functioning in female cotton-top tamarins, *Saguinus oedipus*. *Hormones and Behavior* 29: 40

Capítulo 2

Validaciones fisiológicas, analíticas y métodos de extracción para la determinación de hormonas esteroides en heces de mono aullador negro (*Alouatta pigra*)

Parte de este capítulo ha sido publicado como:

Rangel-Negrín A, Flores-Escobar E, Chavira R, Canales-Espinosa D, Dias PAD (2014) **Physiological and analytical validations of fecal steroid hormone measures in black howler monkeys**. *Primates* 55:459–465. DOI 10.1007/s10329-014-0432-4.

2.1 Resumen

La medición de hormonas en muestras fecales permite la evaluación no invasiva del estado endocrino de los primates en libertad. Sin embargo, los procedimientos y técnicas para el análisis hormonal en las heces deben validarse, tanto analítica como fisiológicamente. Pocos estudios han abordado la endocrinología de los monos aulladores negros (*Alouatta pigra*). Debido a su estado de conservación, el manejo directo de individuos de esta especie y la recolección de muestras invasivas están altamente regulados y, por lo tanto, los métodos tradicionales para la validación de los ensayos hormonales, como las pruebas farmacológicas, no están permitidos. Como consecuencia, en algunas ocasiones los estudios acerca de las hormonas fecales de los monos aulladores negros no reportan validaciones fisiológicas y, por lo tanto, la confiabilidad biológica de tales medidas no puede evaluarse. Con el fin de estimular futuras investigaciones con esta especie, el presente estudio tuvo como objetivo proporcionar bases metodológicas para el monitoreo endocrino fecal. Específicamente, validamos dos métodos de extracción, comparamos la validez de dos inmunoensayos (radioinmunoensayos, RIA; inmunoensayo enzimático quimioluminiscente en fase sólida, SPCEI) realizados con kits comerciales para medir cortisol, testosterona, estradiol y progesterona; y demostramos cómo se pueden determinar las funciones fisiológicas de estas hormonas esteroides a través de validaciones no farmacológicas. Al cotejar los resultados de los dos métodos de extracción empleados en este estudio, resaltó que ambos mostraron porcentajes de recuperación similares en las cuatro hormonas analizadas, promediando 55.3%. No encontramos diferencias entre la validez analítica de los ensayos RIA y SPCEI para medir el cortisol y la testosterona, mientras que para el estradiol y la progesterona RIA mostró mejores resultados. Con respecto a la validación fisiológica de nuestros ensayos, demostramos que: (1) las comparaciones entre situaciones previas y posteriores al estrés pueden usarse para evaluar la respuesta al cortisol, (2) las comparaciones entre machos y hembras pueden usarse para evaluar la variación en los niveles de testosterona, y (3) pueden usarse comparaciones entre hembras embarazadas y no embarazadas para determinar la variación en la actividad de estradiol y progesterona. Las validaciones analíticas y fisiológicas que realizamos demuestran que actualmente hay kits comerciales que permiten el monitoreo endocrino correcto de esta especie, y que existen alternativas no farmacológicas para evaluar la validez fisiológica de las mediciones hormonales.

Palabras clave: Esteroides fecales, cortisol, testosterona, estradiol, progesterona, *Alouatta pigra*.

2.2 Introducción

En mamíferos, los principales grupos de hormonas esteroides son las hormonas sexuales masculinas y femeninas, así como las hormonas producidas por la corteza suprarrenal (Norman y Litwack 1997). Estas hormonas participan en numerosas funciones fisiológicas, incluida la regulación de las respuestas inmunes o comportamiento sexual, y por lo tanto han sido el foco principal de la investigación endocrina en primates no humanos en libertad (Nguyen 2013). Las hormonas esteroides se sintetizan a partir del colesterol, y después del transporte y uso en los tejidos, se inactivan (principalmente en el hígado) y se excretan vía renal en la orina o a través de la bilis en el intestino (Norman y Litwack 1997; Touma y Palme 2005). La medición de hormonas en muestras fecales permite la evaluación no invasiva del estado endocrino de primates en libertad, y en los últimos años ha dado lugar a un crecimiento notable en los estudios de campo acerca de las interacciones endocrino-medio ambientales y endócrino-etológicas (Nguyen 2013).

El desarrollo de técnicas para el análisis de hormonas fecales ha sido de particular relevancia para el estudio de especies silvestres protegidas o en peligro, que generalmente no puede ser sometidas a procedimientos invasivos (Palme 2005). A pesar de dicho desarrollo, y debido a que el metabolismo y la excreción de esteroides difieren significativamente a nivel interespecífico (Palme 2005), en general para muchas especies existe un déficit de información sobre la viabilidad del uso de muestras fecales para el monitoreo endócrino. Además, actualmente existen numerosos estudios basados en mediciones hormonales en heces que no reportan validaciones analíticas o fisiológicas, impidiendo su aplicación en investigaciones sucesivas.

Es así como, aunque los métodos no invasivos han tenido gran auge en los últimos años, ha sido difícil comparar unos resultados con otros, ya que existe una gran diversidad de técnicas y métodos con las cuales se ha venido trabajando en las diferentes áreas. Esto hace de vital importancia unificar criterios de selección de métodos y técnicas con el

fin de establecer en futuros trabajos una metodología común que haga comparable los unos con los otros (Palme 2005; Soto *et al.*, 2006; Suzán, 2006).

El mono aullador negro (*Alouatta pigra*) es una especie de primate arbóreo en peligro de extinción con una distribución geográfica restringida a la península de Yucatán en México, Belice, y algunas partes del norte y centro de Guatemala (Horwich y Johnson 1986). Actualmente hay pocos estudios sobre la endocrinología de esta especie (Martínez-Mota *et al.* 2007, 2008; Van Belle *et al.* 2009a, b; Behie *et al.* 2010; Rangel-Negrín *et al.* 2011). Cabe mencionar que aquellos estudios con esta especie que incluyan manejo directo de individuos y recolección de muestras invasivas están altamente regulados, además de no estar permitido el uso de métodos tradicionales para la validación de ensayos hormonales, tales como los farmacológicos (México: Diario Oficial de la Federación 2013). Como consecuencia, en algunas ocasiones los estudios de las hormonas esteroides fecales de monos aulladores negros en libertad no reportan validaciones fisiológicas (p. ej., Martínez-Mota *et al.* 2007; Van Belle *et al.* 2009a), y por lo tanto la fiabilidad biológica de tales mediciones no puede ser evaluada. Con la finalidad de estimular la investigación con esta especie, el presente estudio tuvo como objetivo proporcionar bases metodológicas para la monitorización endocrina fecal.

Se realizaron los análisis con cuatro hormonas esteroides: cortisol, testosterona, progesterona y estradiol, que pueden ser utilizados para estudios relacionados con fisiología del estrés, ecología reproductiva y relaciones sociales. En primer lugar, se validó analíticamente el método de extracción comparando dos disolventes: etanol y metanol. En segundo lugar, se comparó el rendimiento analítico de dos inmunoensayos (Radioinmunoensayo e Inmunoensayo enzimático quimioluminiscente en fase sólida) llevado a cabo con kits comerciales para medir hormonas esteroides en heces de monos aulladores negros. En tercer lugar, se demostró cómo las funciones fisiológicas de las hormonas esteroides se pueden determinar a través de validaciones no farmacológicas y, por lo tanto, validadas fisiológicamente.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 *Estatutos Éticos*

Esta investigación cumplió con la ley mexicana y fue aprobado por las autoridades correspondientes (SEMARNAT SGPA / DGVS / 01273/06 y 04949/07). Se recolectaron muestras fecales de monos aulladores negros adultos distribuidos en diversas localidades de Campeche, México. Se pueden encontrar descripciones detalladas del área de estudio en: Dias *et al.* (2011) y Rangel-Negrín *et al.* (2011).

2.3.2 *Colecta de muestras fecales*

Las muestras fueron recolectadas de manera oportunista siempre y cuando pudieran ser emparejadas con los individuos a los que pertenecían. Las muestras fecales frescas no contaminadas por orina se recogieron del suelo del bosque y depositados en bolsas de polietileno etiquetadas con la identidad de cada individuo. Dichas muestras se mantuvieron en una nevera portátil junto con paquetes de gel congeladores durante el periodo en campo y almacenadas al final del día en un congelador a -20°C en la estación de campo hasta el momento de la extracción. Las muestras fueron almacenadas a temperatura constante por un máximo de 12 meses hasta la realización de las extracciones. Este procedimiento de congelación utilizado para almacenar las muestras reporta tener un efecto débil en los metabolitos hormonales fecales en otras especies de primates (Khan *et al.*, 2002). Los análisis hormonales se realizaron en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México. Los tamaños de muestra para cada validación se describen a continuación.

2.3.3 Validación de los métodos de extracción

Para evaluar cuál es la mejor técnica de extracción para cada hormona, se dividió cada muestra en dos porciones, y durante el procedimiento de extracción, se varió el tipo de solvente para ver con cuál método se obtiene mayor porcentaje de recuperación de hormona en la muestra.

Para realizar la validación del método de extracción, se usaron 21 muestras de heces ya pesadas disponibles para estos análisis. Se colocó 1 ml de ^{125}I a cada tubo. A 12 de las muestras se les agregó 4 ml de metanol puro (CH_3OH), y a nueve se les agregó 4 ml de etanol puro ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$). Todas se dejaron en un agitador durante 14 horas; posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm por 30 min. Ya que las muestras estaban centrifugadas, se separó el líquido sobrenadante de cada muestra con una micropipeta Pasteur desechable, el cual se decantó a tubos de cristal de borosilicato previamente rotulados con los datos de las muestras. Posteriormente se adicionó 100 μl de cada extracto en los tubos del kit de las hormonas correspondientes (tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos para cada hormona). La determinación de los niveles de hormona en los extractos se realizó mediante RIA. Los tubos se colocaron en un contador gamma (Cobra 5005, Packard) para la lectura de los niveles de hormona.

Los tubos de cristal de borosilicato se pusieron en una gradilla a baño maría a 60°C durante 6.5 horas. Ya que los tubos no tenían líquido, se les agregó 3 ml de buffer (fosfatos con albumina al 4%) a cada uno y se agitaron por 1 min en un vórtex, y por 15 segundos en un zonificador, hasta que se resuspendió el precipitado. Se pipetearon 100 μl de cada extracto en los tubos del kit de las hormonas correspondientes (tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos para cada hormona) y se colocaron en el contador gamma (Cobra 5005, Packard) para la lectura de los niveles hormonales.

2.3.4 Ensayos

Los Radioinmunoensayos hormonales (RIA) se realizaron con kits comerciales de cortisol, testosterona, progesterona y estradiol (todos de Coat-A-Count, SIEMENS, Los Ángeles, CA). Añadimos 25, 50, 100 y 200 µl de los extractos a cada tubo en los kits de cortisol, testosterona, progesterona, y estradiol, respectivamente, e inmediatamente 1 ml de hormona radiomarcada (^{125}I). Después de la incubación a baño maría a 37°C durante 45 min, se vertieron los extractos y los tubos se lavaron con agua destilada. Las concentraciones hormonales se determinaron con un contador gamma (Cobra 5005, Packard, MI).

Para las mediciones hormonales con Inmunoensayo enzimático quimioluminiscente en fase sólida (SPCEI) utilizamos kits comerciales (IMMULITE, SIEMENS, Los Ángeles, CA para todas las hormonas). Añadimos 25, 50, 100 y 200 µl de los extractos a cada tubo en los kits de cortisol, testosterona, progesterona, y estradiol, respectivamente, y se colocaron los tubos en un Analizador 1000 INMULITE (SIEMENS, Munich, Alemania).

Seleccionamos anticuerpos basados en su disponibilidad comercial y en la posibilidad de comparar nuestros datos con otros estudios utilizando los mismos anticuerpos (por ejemplo, Cristóbal-Azkarate *et al* 2006; Clarke *et al* 2007; Martínez-Mota *et al.* 2007; Rangel-Negrín *et al.* 2011). Todas las muestras fueron procesadas por duplicado, y los valores hormonales medios se informan como ng/g de heces secas.

2.3.5 Extracción de las hormonas esteroides para las validaciones analíticas

Para la extracción de esteroides para la validación analítica, se extrajeron los metabolitos hormonales de las heces siguiendo una modificación del método descrito en Wasser *et al.* (2000). Brevemente, 0.6 g de heces homogeneizadas, liofilizadas y pulverizadas se agitaron durante 24 h en 4 ml de etanol puro (CH_3OH). Posteriormente, los extractos fueron

centrifugados (460 g durante 30 min a -4°C) y fue recuperado el sobrenadante que contenía los esteroides. Después de la completa evaporación del solvente (a 60°C), los sedimentos fueron reconstituidos con 3 ml de tampón de albúmina y utilizados para el análisis.

2.3.6 Validaciones analíticas de RIA y SPCEI

Para cada hormona realizamos validaciones de ensayos analíticos y se comparó cualitativamente los resultados de RIA y SPCEI. Específicamente, comparamos la exactitud, a través de curvas de dosis-respuesta y paralelismo (es decir, el procesamiento de diluciones en serie de un pool de extracto fecal y comparándolos con la pendiente de la dosis esperada frente al porcentaje unido a la pendiente de la curva estándar) y la recuperación (es decir, la adición incremental de cantidades conocidas de esteroides a los estándares y la medición del aumento incremental en la concentración) para evaluar la aplicabilidad de estos kits para extractos fecales de monos aulladores negros.

También realizamos controles de calidad que consistían en una muestra fecal común y tres controles de Inmunoensayo (alto, medio y bajo), que nos permitió calcular los coeficientes de variación (CV) intra-ensayo y el inter-ensayo para RIA y para SPCEI. Para cada anticuerpo reportamos la sensibilidad, los rangos de calibración, y volúmenes requeridos según la información proporcionada por los fabricantes.



Figura 2.1 Procesamiento para estudios hormonales. a) extractos de muestras fecales; b) kits comerciales para determinaciones hormonales; c) Contador gamma (Cobra 5005, Packard, MI) para RIA; d) Analizador 1000 INMULITE para SPCEI.

2.3.7 Validaciones fisiológicas

Todas las muestras utilizadas para las validaciones fisiológicas fueron extraídas como se describió anteriormente y analizadas solamente con RIA.

2.3.7.1 Cortisol

Los glucocorticoides son los principales moduladores de las respuestas al estrés fisiológico en vertebrados, y sus concentraciones generalmente aumentan en respuesta a un factor estresante (Sapolsky *et al.* 2000). El cortisol es el principal glucocorticoide en los primates (Stratakis y Chrousos 1995). Para determinar si nuestros ensayos reflejaban cambios en los metabolitos del cortisol, determinamos los efectos de la captura (un estresante agudo) y la anestesia (ketamina; Anesket Vet, Pisa Agropecuaria, Hgo, Mex) en el perfil de excreción de cortisol de tres monos aulladores adultos (un macho y dos hembras), e hicimos la

predicción de que los niveles de cortisol deberían ser más altos después de la captura. Esta captura fue parte de un proyecto de translocación concurrente de monos aulladores negros, y nuestros procedimientos de captura y manejo (Canales-Espinosa *et al.* 2011) fueron aprobados por las autoridades mexicanas (SEMARNAT, SGPA / DGVS / 10637/11). Recolectamos todas las muestras de heces (N=42) de los tres individuos desde 72 h antes hasta 96 h después de la captura, y comparamos los niveles previos a la captura con las concentraciones máximas (es decir, los valores más altos post-estresores que fueron $\geq 2 \times \text{SD}$ por encima de la concentración media antes de la captura: Martínez-Mota *et al.* 2008) con una prueba de Wilcoxon de rango firmado.

2.3.7.2 Testosterona

La testosterona es el andrógeno primario, y aunque es secretada en la corteza suprarrenal y ovarios de las hembras, es producido en cantidades mucho mayores por las células de Leydig de los testículos (Swerdlow *et al.* 2009). En primates, los niveles de testosterona circulante son más altos en los machos que en las hembras (Dixson 2013). Con base en estas diferencias fisiológicas, para determinar si nuestros ensayos reflejaron cambios en los metabolitos de testosterona comparamos los niveles de testosterona de ocho machos adultos y ocho hembras adultas (N=16) con pruebas de Mann-Whitney con la predicción de que las primeras deben ser más altas que las segundas.

2.3.7.3 Estradiol y Progesterona

La progesterona y los estrógenos son las principales hormonas reproductivas de las primates hembras. La progesterona y el estradiol tienen funciones esenciales en la fisiología del embarazo, incluida la regulación de la interacción dinámica entre la madre, la placenta y el feto (Pepe y Albrecht 1995). En promedio, sus concentraciones son más altas durante el embarazo que en otros momentos (Ryan y Hopper 1974; Hodgen e Itskovitz 1988). Por lo tanto, para determinar si nuestros ensayos detectaron variaciones en los metabolitos de estradiol y progesterona, comparamos las concentraciones fecales de estas

hormonas entre hembras adultas embarazadas y no embarazadas y predijimos que tanto el estradiol como la progesterona deberían ser mayores durante el embarazo. Las hembras se clasificaron como embarazadas calculando 180 días antes de los partos observados (duración de gestación de 184 días: Van Belle *et al.* 2009b). Comparamos los niveles de estradiol y progesterona entre cuatro hembras embarazadas (N=21 muestras fecales) y cinco hembras adultas no embarazadas (N=29) con las pruebas de Mann-Whitney.

2.3.8 *Análisis de datos*

Para determinar si existían diferencias entre métodos de extracción en los porcentajes de recuperación de cada hormona, se usaron pruebas de chi-cuadrada de bondad-de-ajuste para frecuencias esperadas similares. Para conocer si las hormonas de los extractos interactuaron con los anticuerpos de manera similar a los esteroides estándar (i.e. paralelismo) se usaron pruebas de correlación de Spearman. Con el mismo tipo de análisis, se verificó la asociación entre los puntos de las curvas estándar y los valores de las muestras con los valores de las curvas estándar (i.e. curva dosis respuesta). Para interpretar de manera más sólida estos resultados, en el texto se presentan los coeficientes de determinación de cada prueba. Todos los análisis se realizaron con SPSS v.22.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., EE. UU.). El umbral estadístico se estableció en $p \leq 0.05$.

2.4 **Resultados**

2.4.1 *Validación métodos de extracción*

El porcentaje de recuperación registrado con metanol para cortisol fue del 56.37%, y con etanol del 56.13%. Se determinó que no existieron diferencias significativas entre los dos métodos de extracción en términos del porcentaje de recuperación de cortisol ($\chi^2 = 0.194$, $p = 0.660$). Para estradiol, se observó que el porcentaje de recuperación de

hormona registrado con metanol (53.96%) fue significativamente menor que con etanol (56%) ($\chi^2 = 9.542$, $p = 0.002$). El porcentaje de recuperación de progesterona denotó un resultado similar entre los dos métodos de extracción: 50% con metanol y 50.93% con etanol ($\chi^2 = 3.1058$, $p = 0.0780$). Al comparar la extracción de acuerdo al tipo de diluyente, encontramos una mayor recuperación de testosterona en las muestras que fueron tratadas con metanol (59.65%), a comparación de lo obtenido con etanol (59.38%). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($\chi^2 = 0.170$, $p = 0.680$).

Tabla 2.1. Porcentaje de recuperación según el método de extracción utilizado para cada hormona.

Hormona	Diluyente	
	metanol	etanol
Cortisol	56.37%	56.13%
Estradiol	53.96%	56.00%
Progesterona	50.00%	50.93%
Testosterona	59.65%	59.38%

2.4.2 Validación analítica

Las pruebas de dosis-respuesta, paralelismo y recuperación sugieren que tanto el ensayo RIA como el SPCEI que se realizaron midieran adecuadamente el cortisol y la testosterona en las heces de los monos aulladores negros (Tabla 2.2). Para el estradiol y la progesterona, los resultados de dosis-respuesta y recuperación obtenidos con los ensayos RIA fueron superiores a los de SPCEI. La Tabla 2.3 ayuda facilita la comprensión de cuál método se desempeñó mejor en cada prueba de validación para cada hormona.

2.4.3 Validación fisiológica

Los niveles de cortisol alcanzaron su punto máximo a una media (\pm SD) de $35,3 \pm 9,9$ h después de la captura. Los niveles máximos fueron

significativamente más altos que los niveles de precaptura para los tres individuos (hembra 1: $Z = 2.27$, N antes de la captura = 6, N después = 7, $p < 0.05$; hembra 2: $Z = 3.29$, N antes = 7, N después = 7, $p < 0.001$; macho: $Z = 3.41$, N antes = 8, N después = 7, $p < 0.001$; Fig. 2.2a), lo que indica que nuestros ensayos de cortisol midieron de manera confiable las respuestas suprarrenales de los monos aulladores negros a un estresor agudo. Los niveles promedio (\pm SD) de testosterona en muestras masculinas ($4,485.6 \pm 234.3$ ng/ml) fueron casi 580% más altos que en las muestras femeninas (659.1 ± 206.7 ng/ml; $Z = 14.03$, $p < 0.001$; Fig. 2.2b).

Las concentraciones de progesterona y estradiol fueron significativamente más altas (progesterona $Z = 2.47$; N embarazadas = 21, N no embarazadas = 29, $p = 0.011$; estradiol $Z = 3.17$, N embarazadas = 21, N no embarazadas = 29, $p < 0.001$) en hembras embarazadas (media \pm SD progesterona = 634.5 ± 21.4 ng/g; estradiol = 14.1 ± 4.4 ng/g) que en hembras no embarazadas (progesterona = 409.1 ± 350.0 ng/g; estradiol = 6.5 ± 4.8 ng / g) Fig. 2.2 c y d).

Tabla 2.2 Validación de los métodos RIA y SPCEI para medir esteroides fecales en monos aulladores negros (*Alouatta pigra*).

Hormona (fabricante)	Ensayo	Exactitud		Porcentaje de Recuperación ± S.E.	Intra- ensayo CV (N)	Inter- ensayo CV (N)	Sensibilidad	Rango de Calibración	Vol. requerido (μ l)
		Curvas D-R ^a	Paralelismo ^b						
Cortisol (Siemens)	RIA	$y = 4.95 + 0.29^*x$; $r^2 = 0.99, p < 0.01$	$r = 1.55, p = 0.172$	$103.4 \pm 24.8 \%$	7.16 % (58)	8.35 % (58)	0.2 μ l/dL	1–50 μ g/dL	25
Cortisol (Siemens)	SPCEI	$y = -0.49 + 0.18^*x$; $r^2 = 0.99, p < 0.01$	$r = 0.58, p = 0.58$	$114.4 \pm 18.2 \%$	5.21 % (60)	6.28 % (60)	0.2 μ l/dL	1–50 μ g/dL	100
Testosterona (Siemens)	RIA	$y = -0.02 + 0.47^*x$; $r^2 = 0.99, p < 0.01$	$r = 0.68, p = 0.519$	$81.3 \pm 21.7 \%$	6.45 % (58)	7.95 % (58)	4 ng/dL	20–1,600 ng/dL	50
Total testosterona (Siemens)	SPCEI	$y = -7.87 + 0.59^*x$; $r^2 = 0.97, p < 0.02$	$r = 0.44, p = 0.674$	$60.2 \pm 26.6 \%$	5.61 % (60)	6.72 % (60)	15 ng/dL	20–1,600 ng/dL	20
Estradiol (E ₂ , Siemens)	RIA	$y = 490 + 0.89^*x$; $r^2 = 0.99, p < 0.01$	$r = 0.64, p = 0.543$	$149.9 \pm 33.3 \%$	6.52 % (58)	7.52 % (58)	8 pg/mL	20–3,600 ng/dL	100
Estradiol (E ₂ , Siemens)	SPCEI	$y = 335 + 0.47^*x$; $r^2 = 0.82, p = 0.09$	$r = 0.99, p = 0.356$	$26.8 \pm 10.0 \%$	8.56 % (45)	9.54 % (45)	15 pg/mL	20–2,000 ng/dL	25
Progesterona (Siemens)	RIA	$y = 3.83 + 0.07^*x$; $r^2 = 0.95, p = 0.03$	$r = 1.39, p = 0.212$	$76.1 \pm 26.5 \%$	7.12 % (58)	8.15 % (58)	0.02 ng/mL	0.2–20 ng/mL	100
Progesterona (Siemens)	SPCEI	$y = 4.95 + 0.29^*x$; $r^2 = 0.86, p = 0.07$	$r = 0.05, p = 0.958$	$42.6 \pm 36.2 \%$	7.59 % (45)	8.72 % (45)	0.02 ng/mL	0.1–40 ng/mL	50

Las muestras fueron diluidas 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16

^a N = 4

^b N = 5

Tabla 2.3 Desempeño general de RIA y SPCEI. La marca señala el mejor ensayo para cada hormona en cada prueba de validación analítica.

Hormona	Ensayo	Exactitud		Intra- ensayo CV (N)	Inter- ensayo CV (N)	Especificidad	Sensibilidad	Rango de Calibración	Vol. requerido (µl)
		Paralelismo	Curvas D-R						
Cortisol	RIA	■	■				■	■	■
	SPCEI			■	■	■	■	■	
Testosterona	RIA		■				■	■	
	SPCEI	■		■	■	■		■	■
Estradiol	RIA		■	■	■		■	■	
	SPCEI	■				■			■
Progesterona	RIA	■	■	■	■	■	■		
	SPCEI			■	■	■	■	■	■

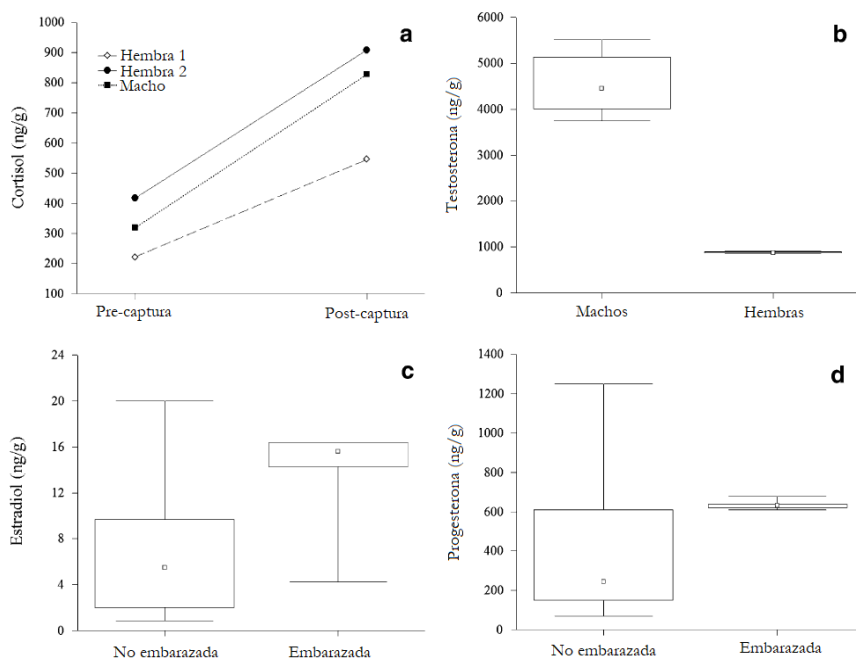


Figura 2.2 Validaciones fisiológicas. Cortisol (a; N pre-captura = N post-captura = tres individuos), testosterona (b; N machos = N hembras = ocho individuos), estradiol (c; N hembras no embarazadas = cinco, N hembras embarazadas = cuatro), y progesterona (N hembras no embarazadas = cinco, N hembras embarazadas = cuatro) medido en heces de monos aulladores negros. En b, c y d: mediana \square 25 % – 75 % \perp min–max.

2.5 Discusión

El presente estudio tenía tres objetivos: contrastar dos métodos de extracción (etanol y metanol) para medir las hormonas esteroides, comparar la validez de dos inmunoensayos realizados con kits comerciales para medir esas mismas hormonas esteroides en heces de monos aulladores negros, y demostrar cómo las funciones fisiológicas de las hormonas esteroides que se midieron en las heces de esta especie se pueden determinar a través de validaciones no farmacológicas.

Los resultados de los dos métodos de extracción empleados mostraron porcentajes de recuperación similares en las cuatro hormonas analizadas, promediando 55.3% (≈ 50 -59.65%, dependiendo de la

hormona). Esto coincide con lo hallado por otros estudios (Wasser y Hunt 2005) donde se llevó a cabo la comparación entre etanol y metanol con el propósito de medir la recuperación de glucocorticoides, y ambos métodos reportaron valores similares.

La eficacia de recuperación hormonal fue más baja que en otros estudios en los que se han registrado valores entre 70-95% (Wasser *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2004; Van Belle *et al.*, 2009a). Esto podría deberse a la diferencia en el tiempo que se agitaron las muestras en el vórtex (Ziegler y Wittwer, 2005). Asimismo, normalmente se consiguen porcentajes de recuperación más altos con muestras húmedas (Cristóbal-Azkarate *et al.*, 2007, Martínez-Mota *et al.*, 2007, 2008; Van Belle *et al.*, 2009b), sin embargo, la concentración de humedad puede entorpecer la medición de las concentraciones hormonales, lo que contrasta con el hecho de que al secar las muestras se reduce la variación en la cantidad de flujo, lo que deriva en valores finales más consistentes de concentraciones esteroides (Wasser *et al.*, 1993); de manera que es preferible realizar la medición de hormonas en muestras secas.

Aunque los dos diluyentes son utilizados indistintamente (Rangel-Negrín *et al.*, 2009; Hunt *et al.*, 2004; Hernández, 2006; Ziegler *et al.*, 2000). Dado que las diferencias en costos y desempeño no son significativas para extracciones de hormonas en estos primates, es recomendable usar por lo menos 30% de solvente, ya sea etanol o metanol, o incluso una mezcla de ambos (Ziegler y Wittwer 2005). La ventaja de esto reside en que tanto esteroides conjugados, como sin conjugar, serán extraídos de la muestra fecal.

No encontramos diferencias entre la validez de los ensayos RIA y SPCEI para medir el cortisol y la testosterona, mientras que, para el estradiol y la progesterona, RIA mostró mejores resultados. Con respecto a la validación fisiológica de nuestros ensayos, demostramos que: (1) las comparaciones entre situaciones previas y posteriores al estrés pueden usarse para evaluar la respuesta al cortisol, (2) las comparaciones entre hembras y machos pueden usarse para evaluar la variación en los niveles de testosterona, y (3) pueden usarse comparaciones entre hembras embarazadas y no embarazadas para

determinar la variación en la actividad de estradiol y progesterona. Es importante señalar que la evidencia comparativa respalda la relevancia biológica de nuestras mediciones hormonales: los niveles de cortisol fecal que encontramos son comparables a los reportados por Martínez-Mota *et al.* (2007) a pesar de varias diferencias en la metodología de ensayo entre estudios (por ejemplo, método de inmunoensayo). Además, los niveles de cortisol fecal de los monos aulladores negros medidos en el presente estudio fueron más bajos que los de los monos araña medidos por un método similar (Rangel-Negrín *et al.* 2009), como se esperaba por comparaciones interespecíficas previas realizadas en condiciones controladas (Coe *et al.* 1992).

Nuestros resultados indican que el rendimiento analítico de los kits de cortisol y testosterona que están disponibles en México para medir estas hormonas en las heces de los monos aulladores negros no varía entre RIA y SPCEI. Debido a que RIA está altamente regulado debido a los requisitos de seguridad asociados con el uso y eliminación de material radiactivo y requiere una instrumentación más costosa (Hodges *et al.* 2010), los kits comerciales basados en el análisis SPCEI pueden ser la mejor opción para estudiar estas hormonas en monos aulladores negros. Para las hormonas sexuales femeninas, SPCEI tuvo un rendimiento más bajo, probablemente porque ambos kits tuvieron mayor reactividad cruzada con otros compuestos que los kits RIA (Siemens 2014), lo que sugiere que se debe usar RIA y que se deben probar kits alternativos.

Debido a que el metabolismo hormonal y las rutas de excreción pueden diferir entre las especies (Palme *et al.* 2005), es crucial validar fisiológicamente los ensayos para garantizar el significado biológico de los análisis (Heistermann *et al.* 2006; Goymann 2012). Esto es particularmente importante cuando se usan kits comerciales desarrollados para la medición de hormonas en sangre con heces o muestras de orina, como en el caso del presente estudio (Hodges *et al.* 2010). Los kits comerciales a menudo se basan en anticuerpos altamente específicos para la hormona nativa, pero con reactividades cruzadas desconocidas con los metabolitos hormonales, que generalmente representan la mayoría de las hormonas excretadas. Los esteroides

nativos se degradan en varios metabolitos a través del metabolismo hepático, la actividad microbiana durante el paso intestinal y la reabsorción en la circulación enterohepática (Palme *et al.* 1996). Además, el metabolismo de las hormonas del estrés, como el cortisol, y las hormonas gonadales, como la testosterona, pueden producir metabolitos fecales con estructuras similares porque las hormonas nativas tienen estructuras similares (Norman y Litwack 1997). Por lo tanto, los inmunoensayos diseñados para evaluar el estrés midiendo la concentración de metabolitos de glucocorticoides fecales pueden reaccionar de forma cruzada con otros metabolitos de esteroides, distorsionando los resultados. Para garantizar que un inmunoensayo mide de manera confiable el estado endocrino de un animal, se debe demostrar experimentalmente que es capaz de cuantificar la variación en las concentraciones hormonales en función de sus funciones fisiológicas conocidas. En este estudio demostramos que tales validaciones pueden realizarse de forma no invasiva.

Para mejorar aún más la confiabilidad del análisis hormonal no invasivo, en futuros estudios se podría utilizar el análisis de cromatografía líquida de alta presión para obtener información sobre las hormonas y los metabolitos hormonales excretados en las heces de los monos aulladores negros y evaluar la especificidad de los ensayos realizados (Bahr *et al.* 2000; Rangel-Negrín *et al.* 2011; pero ver Hodges *et al.* 2010).

En conclusión, nuestros resultados proporcionan bases metodológicas para el estudio no invasivo de las hormonas esteroides en las heces del mono aullador negro en peligro de extinción. Las validaciones analíticas y fisiológicas que realizamos demuestran que los kits comerciales actualmente disponibles permiten un monitoreo endocrino correcto de esta y otras especies de primates, y que existen alternativas no farmacológicas para evaluar la validez fisiológica de las mediciones hormonales. Queda para futuras investigaciones analizar otros temas básicos sobre el estudio no invasivo de la endocrinología de los monos aulladores negros. Entre estos, evaluar los efectos del almacenamiento de la muestra en las concentraciones hormonales (p. ej.,

Khan *et al.* 2002) y comparar la eficiencia de las extracciones "amigables con el campo" (p. ej., Van Belle *et al.* 2009a) con las extracciones de laboratorio convencionales (p. ej., Rangel-Negrín *et al.* 2011) serán de suma importancia.

2.6 Referencias

- Bahr NI, Palme R, Möhle U, Hodges JK & Heistermann M (2000) Comparative aspects of the metabolism and excretion of cortisol in three individual non-human primates. *Gen Comp Endocrinol* 117:427–438.
- Behie AM, Pavelka MS & Chapman CA (2010) Sources of variation in fecal cortisol levels in howler monkeys in Belize. *Am J Primatol* 72:600–606.
- Canales-Espinosa D, Dias PAD, Rangel-Negrín A, Aguilar-Cucurachi S, García-Orduña F & Hermida-Lagunes J (2011) Translocación de primates mexicanos. En: Dias PAD, Rangel-Negrín A, Canales-Espinosa D (Eds) La conservación de los primates en México. Consejo Veracruzano de Ciencia y Tecnología, Xalapa, p 1–107
- Clarke M, Zucker EL, Randall TF & Harrison RM (2007) Behavior and endocrine concentrations do not distinguish sex in monomorphic juvenile howlers (*Alouatta palliata*). *Am J Primatol* 69:477–484.
- Coe CL, Savage A & Bromley LJ (1992) Phylogenetic influences on hormone levels across the primate order. *Am J Primatol* 28:81–100.
- Cristóbal-Azkarate J, Chavira R, Boeck L, Rodríguez-Luna E & Veá JJ (2006) Testosterone levels of free-ranging resident mantled howler monkey males in relation to the number and density of solitary males: a test of the challenge hypothesis. *Horm Behav* 49:261–267
- _____, Chavira R, Boeck L, Rodríguez-Luna E & Veá JJ (2007). Glucocorticoid levels in free ranging resident mantled howlers: A study of coping strategies. *Am. J. Primatol.* 69: 866–876.
- Diario Oficial de la Federación (2013) Ley general de vida silvestre. México D.F.: Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión.
- Dias PAD, Rangel-Negrín A & Canales-Espinosa D (2011) Effects of lactation on the time-budgets and foraging patterns of female black howlers (*Alouatta pigra*). *Am J Phys Anthropol* 145:137–146.
- Dixon AF (2013) Primate sexuality: comparative studies of the prosimians, monkeys, apes, and humans, 2nd edn. Oxford University Press, New York.

- Goymann W (2012) On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: the problem with sex, diet, metabolic rate and the individual. *Methods Ecol Evol* 3:757–765.
- Heistermann M, Palme R & Ganswindt A (2006) Comparison of different enzyme immunoassays for assessment of adrenocortical activity in primates based on fecal samples. *Am J Primatol* 68:257–273.
- Hernández MSE, Portillo LB, Valdéz RA, Brousset HJDM & Romano PM. (2006). Determinación de estacionalidad reproductiva en ocelotes (*Leopardus pardalis*) hembras y machos mantenidas en cautiverio por medio de Radioinmunoanálisis en heces. Memorias del Taller de Técnicas no invasivas para la evaluación del estado de salud y bienestar en animales silvestres. Dpto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias CINVESTAV, DGZCM, UNAM. México.
- Hodgen GD & Itskovitz J (1988) Recognition and maintenance of pregnancy. In: Knobil E, Neill JD (Eds) The physiology of reproduction. Raven, New York, p 1995–2021.
- Hodges K, Brown J & Heistermann M (2010) Endocrine monitoring of reproduction and stress. En: Kleiman DG, Thompson KV, Kirk Baer C (Eds) Wild mammals in captivity: principles and techniques for zoo management. The University of Chicago Press, Chicago, p. 447–468.
- Horwich RH & Johnson ED (1986) Geographical distribution of the black howler (*Alouatta pigra*) in Central America. *Primates* 27:53–62.
- Hunt KE, Trites AW & Wasser SK (2004). Validation of a fecal glucocorticoid assay for Stellar sea lions (*Eumetopias jubatus*). *Physiol. Behav.* 80: 595–601.
- Khan MZ, Altmann J, Isani SS & Yu J (2002) A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. *Gen Comp Endocrinol* 128:57–64.
- Lynch JW, Khan MZ, Altmann J, Njahira MN & Rubenstein N (2003) Concentrations of four fecal steroids in wild baboons: short-term storage conditions and consequences for data interpretation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132:264–271.

- Martínez-Mota R, Valdespino C, Sánchez-Ramos MA & Serio-Silva JC (2007) Effects of forest fragmentation on the physiological stress response of black howler monkeys. *Anim Conser* 10:374–379.
- _____, Valdespino C, Rivera Revollo JA & Palme R (2008) Determination of fecal glucocorticoid metabolites to evaluate stress response in *Alouatta pigra*. *Int J Primatol* 29:1365–1373.
- Nguyen N (2013) Primate behavioral endocrinology. In: Sterling EJ, Bynum N, Blair MR (Eds) *Primate ecology and conservation*. Oxford University Press, Oxford, p 224–237.
- Norman AW & Litwack G (1997) *Hormones*, 2nd edn. Academic Press, New York.
- Palme R (2005) Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. *Ann NY Acad Sci* 1046:75–80.
- _____, Fischer P, Schildorfer H & Ismail MN (1996) Excretion of infused ^{14}C -steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Anim Reprod Sc* 43:43–63.
- Palme R, Rettenbacher S, Touma C, El- Bahr SM & Möstl E (2005) Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann NY Acad Sci* 1040:162–171.
- Pepe GJ & Albrecht ED (1995) Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr Rev* 16:608–648.
- Rangel-Negrín A, Alfaro JL, Valdez RA, Romano MC & Serio-Silva JC (2009) Stress in Yucatan spider monkeys: effects of environmental conditions on fecal cortisol levels in wild and captive populations. *Anim Conserv* 12:496–502.
- _____, Dias PAD, Chavira R & Canales-Espinosa D (2011) Social modulation of testosterone in male black howlers (*Alouatta pigra*). *Horm Behav* 59:159–166.
- Ryan KJ & Hopper BR (1974) Placental biosynthesis and metabolism of steroid hormones in primates. *Contrib Primatol* 3:258–283.
- Sapolsky RM, Romero LM & Munck AU (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? *Endocr Rev* 21:55–89.
- Siemens (2014) Healthcare Siemens. <http://usa.healthcare.siemens.com>.

- Stratakis CA & Chrousos GP (1995) Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann NY Acad Sci* 771:1–18.
- Swerdloff RS, Wang C & Sinha-Hikim AP (2009) Hypothalamicpituitary-gonadal axis in men. En: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT (eds) Hormones, brain, and behavior, 2nd edn. Academic Press, San Diego, Part V, p 2357–2393.
- Touma C & Palme R (2005) Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of a biological validation. *Ann NY Acad Sci* 1046:54–74.
- Van Belle S, Estrada A, Ziegler TE & Strier KB (2009a) Social and hormonal mechanisms underlying male reproductive strategies in black howler monkeys (*Alouatta pigra*). *Horm Behav* 56:355–363
- , Estrada A, Ziegler TE & Strier KB (2009b) Sexual behavior across ovarian cycles in wild black howler monkeys (*Alouatta pigra*): male mate guarding and female mate choice. *Am J Primatol* 71:153–164.
- Wasser SK & Hunt KE. 2005. Noninvasive measures of reproductive function and disturbance in the barred owl, great horned owl, and northern spotted owl. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1046: 109-137.
- , Hunt KE, Brown JL, Cooper K, Crockett CM, Bechert U, Millsbaugh JJ, Larson S & Monfort SL (2000) A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *Gen Comp Endocrinol* 120:260–275.
- , Thomas R, Nair PP, Guidry C, Southers J, Lucas J, Wildt DE & Monfort SL (1993). Effects of dietary fibre on fecal steroid measurements in baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus*). *J. Rep. Fert.* 97: 569–574.
- Young KM, Walker SL, Lanthier C, Waddell WT, Monfort SL & Brown JL. (2004). Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. *Gen. Comp. Endocrinol.* 137:148–165.
- Ziegler T, Hodges K, Winkler P & Heistermann M (2000). Hormonal correlates of reproductive seasonality in wild female hanuman langurs (*Presbytis entellus*). *Am. J. Primatol.* 51: 119–134.

- _____ & Wittwer DJ (2005). Fecal steroid research in the field and laboratory: improved methods for storage, transport, processing, and analysis. *Am. J. Primatol.* 67: 159-174.

Capítulo 3

Respuesta a corto plazo frente a la variación en la disponibilidad de alimento

Parte de este capítulo ha sido publicado como:

Ariadna Rangel-Negrín, Elizabeth Flores-Escobar, Alejandro Coyohua-Fuentes, David Roberto Chavira-Ramírez, Domingo Canales-Espinosa, Pedro Américo D. Dias (2015) **Behavioural and Glucocorticoid Responses of a Captive Group of Spider Monkeys to Short-Term Variation in Food Presentation**. *Folia Primatol* 2015; 86:433–445. DOI: 10.1159/000441059.

3.1 Resumen

La presentación de alimentos puede afectar la competencia alimentaria y el bienestar de especies sociales en cautiverio. Realizamos un experimento en un grupo cautivo de cinco monos araña negros (*Ateles geoffroyi*) con la hipótesis de que la competencia de alimentación debería aumentar en respuesta a ciertas presentaciones de alimento en términos de tamaño, distribución y calidad de los alimentos; y que una mayor competencia por recursos debería conducir a un aumento en agonismo y estrés fisiológico (medido por metabolitos de glucocorticoides fecales, MGCF), así como a una disminución en la afiliación, proximidad entre individuos y actividad trófica. Utilizamos cinco tratamientos experimentales que representan diferentes combinaciones de tamaño, distribución y calidad de los alimentos. Observamos interacciones sociales durante 100 h, recolectamos 6,500 registros de actividad de alimentación y proximidad, y recolectamos 226 muestras fecales. Cuando los alimentos estaban agrupados, los individuos pasaban menos tiempo alimentándose, y también había una variación individual significativa en la actividad alimentaria dentro de los tratamientos. Los niveles de MGCF fueron más altos cuando los alimentos se agruparon. Estos resultados probablemente estén relacionados con un aumento en la competencia alimentaria cuando se concentran los recursos. Al menos en pequeños grupos de monos araña, dispersar los alimentos en dos estaciones de alimentación puede ser suficiente para disminuir las diferencias entre los individuos en prioridad de acceso a los recursos alimenticios, reduciendo así el estrés fisiológico y las diferencias interindividuales en la actividad alimentaria.

Palabras clave: *Ateles*, cautiverio, comportamiento trófico, competencia por recursos, monopolización del alimento, estrés fisiológico.

3.2 Introducción

La competencia por los recursos alimenticios es una consecuencia inevitable de la vida en grupo y una de las principales fuerzas evolutivas que influyen en la organización social de muchos animales (Alexander 1974; Krause & Ruxton 2002). Cuando el alimento se distribuye de manera que puede ser monopolizado o defendido, se puede producir un acceso diferencial a los recursos entre los miembros del grupo, lo que lleva a disputas directas para el acceso a los alimentos en forma de agresión, desplazamiento o evasión (Wrangham 1980; Blanckenhorn *et al.*, 1998; Grant *et al.*, 2000). En la naturaleza, los individuos pueden decidir si participar o no en competencia directa con conspecíficos, y se ha demostrado que muchos animales exhiben estrategias de manejo de conflictos para lidiar con la competencia por los recursos (Aureli & de Waal 2000). En contraste, las restricciones espaciales, junto con la presencia y gestión humanas, pueden limitar la capacidad de individuos cautivos para mostrar sus patrones de comportamiento natural (Hosey 2005; Mason 2010), lo que podría llevar a una mayor competencia por los recursos.

En el medio natural, la disponibilidad de recursos tróficos generalmente sigue patrones altamente complejos. Los recursos alimenticios varían en el espacio en términos de tamaño, densidad, distribución y calidad (Chapman & Chapman 2000), además de también variar con el tiempo (van Schaik *et al.*, 1993). La interacción entre la disponibilidad espacial y temporal de los recursos alimentarios determinará la posibilidad de monopolizar los parches de alimento (Goss-Custard *et al.*, 1984; Grenier *et al.*, 1999; Weir & Grant 2004). Por ejemplo, cuando el alimento se presenta en parches discretos, la agrupación espacial y la dispersión temporal de los parches pueden originar la monopolización de los recursos, mientras que la dispersión espacial y una alta abundancia de alimento reducen la capacidad de defensa de los parches de alimento (Goldberg *et al.*, 2001; Mathy & Isbell, 2001). Cuando se produce la monopolización del alimento, puede surgir competencia dentro del grupo, ya sea directamente, a través del

despliegue de conductas ritualizadas o agresivas, o indirectamente, a través de relaciones de dominancia (Goss-Custard *et al.*, 1984; Grenier *et al.*, 1999; Mathy & Isbell, 2001; Weir & Grant, 2004). Además de su influencia en el establecimiento y mantenimiento de las relaciones sociales entre los miembros del grupo, la competencia por los recursos representa un factor estresante para muchas especies animales, como lo demuestran los cambios en la secreción de glucocorticoides (por ejemplo, primates (Abbott *et al.*, 2003)) o ritmo cardíaco (por ejemplo, cerdos, *Sus scrofa* (de Jong *et al.*, 2000)) en individuos que compiten por alimento. Por lo tanto, cuando es posible monopolizar los recursos tróficos, puede surgir competencia por estos y afectar el comportamiento y la fisiología del estrés de los individuos.

Aunque en las últimas décadas se han dedicado muchos esfuerzos para hacer que los entornos sociales y físicos de los animales en cautiverio sean más complejos y naturales (Shyne 2006; Whitham & Wielebnowski, 2013), la variación espacial y temporal en la disponibilidad de alimentos en cautiverio usualmente difiere dramáticamente de la observada en la naturaleza. A nivel temporal, los animales en cautiverio reciben alimentos regularmente en horarios fijos predecibles, y no necesitan perder tiempo para encontrarlos (Swaigood & Shepherdson, 2005; Morgan & Tromborg, 2007). Además, los alimentos se presentan comúnmente en forma procesada, lo que reduce aún más la necesidad de forrajear (Morgan & Tromborg 2007). Como consecuencia, los animales cautivos pasan menos tiempo buscando y alimentándose que sus homólogos salvajes (Britt, 1998; Lukas, 1999; Höhn *et al.*, 2000; Kerridge, 2005). A nivel espacial, aunque los beneficios de la dispersión del alimento en el sustrato han sido reconocidos durante varias décadas, los alimentos a menudo se entregan en lugares predecibles en contenedores que representan grupos de alimentos monopolizables discretos (Anderson & Chamove, 1984; Forthman *et al.*, 1992; Swaigood & Shepherdson, 2005).

Por lo tanto, los animales en cautiverio a menudo enfrentan una variación espacial y temporal reducida en la disponibilidad de alimentos, lo que podría facilitar la monopolización de los recursos y, como consecuencia, aumentar la competencia por recursos. Aunque ningún

estudio ha comparado directamente la competencia de alimentación entre individuos silvestres y cautivos de una especie, existe evidencia de que la frecuencia de interacciones agresivas es mayor entre los individuos cautivos que entre los silvestres (i.e., asnos silvestres somalíes, *Equus africanus somalicus* (Asa *et al.*, 2012); canguros grises orientales, *Macropus giganteus* (Höhn *et al.*, 2000)). En este contexto, las decisiones sobre la presentación de alimentos afectarán en la competencia trófica y pueden ser críticas para el bienestar de las especies sociales mantenidas en cautiverio (Young, 1997; Kawata, 2008).

Los monos araña son primates neotropicales que viven en comunidades de 15 a 56 individuos (Shimooka *et al.*, 2008), que ocupan rangos de hasta 963 ha (Di Fiore & Campbell, 2007). Las comunidades de monos araña se caracterizan por un alto grado de dinámica de fisión-fusión (Aureli *et al.*, 2008), con individuos que forman subgrupos pequeños que varían en tamaño y composición con frecuencia a lo largo del día (Symington, 1990; Chapman *et al.*, 1995). La fisión-fusión representa una estrategia para hacer frente a las presiones contrastantes de evitar a los depredadores (lo que favorece a los grandes subgrupos) y minimizar la competencia por los alimentos (lo que favorece a los pequeños subgrupos) cuando existe una fluctuación temporal o espacial en la presión por depredación y la disponibilidad de alimento (Boesch & Boesch-Achermann, 2000; Aureli *et al.*, 2008). Las interacciones sociales dentro de los grupos son en su mayoría afiliativas, con agresiones infrecuentes (Fedigan & Baxter, 1984; Symington, 1987; van Roosmalen & Klein, 1988; Slater *et al.*, 2009). Aunque los monos araña son comunes en los zoológicos (Sistema Internacional de Identificación de Especies, 2015), las poblaciones cautivas rara vez se han estudiado. Los datos disponibles indican que las interacciones afiliativas entre hembras son más frecuentes en cautiverio (van Roosmalen & Klein, 1988), asimismo, se sabe que la agresión entre machos es más frecuente en cautividad que en la naturaleza, y de igual manera, una cantidad considerable de esas agresiones implica una agresión letal o grave entre machos (Davis *et al.*, 2009). Esta diferencia en el patrón de las interacciones sociales entre monos araña salvajes y cautivos se ha interpretado como una posible consecuencia de varios factores, entre ellos el albergar hembras

familiares juntas, el confinamiento de machos desconocidos o las pocas oportunidades de fisión ofrecidas por recintos pequeños (Pastor-Nieto, 2001; Davis *et al.*, 2009).

Debido a que las condiciones en cautiverio pueden afectar el bienestar de los monos araña a través de incrementos en la agresión, es importante investigar qué factores en ese ambiente afectan el comportamiento social y las respuestas fisiológicas de estrés de los individuos. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue abordar por primera vez el impacto de la variación en la presentación de los alimentos en la competencia trófica en monos araña, y para este fin, nos enfocamos en un grupo cautivo de monos araña de manos negras (*Ateles geoffroyi*). Basado en el patrón de competencia por alimento reportado en estudios previos con primates (Wrangham, 1980; van Schaik, 1989; Sterck *et al.*, 1997), y específicamente en estudios de primates en cautiverio que indican que el agrupar el alimento conduce a aumentos en la competencia trófica (Gil-Burmann *et al.*, 1998; Stahl & Kaumanns, 2003), nuestra hipótesis de trabajo fue que la competencia trófica debería aumentar en respuesta a ciertas presentaciones de alimentos en términos de tamaño, distribución y calidad de los parches de alimentos. Una mayor competencia en la alimentación debería llevar a las siguientes respuestas de comportamiento y fisiológicas: aumento del agonismo, disminución de la afiliación, disminución de la proximidad entre los individuos, disminución de la actividad de alimentación y aumento del estrés fisiológico (medido a través de concentraciones de metabolitos de glucocorticoides fecales, MGCF en lo sucesivo). Específicamente, planteamos la hipótesis de que: (1) si el tamaño de los parches de alimentos es el atributo principal que determina la competencia trófica, la competencia debería aumentar cuando los alimentos se distribuyen en parches pequeños; (2) si la calidad de los parches para alimentos es el atributo principal que determina la competencia trófica, la competencia por el alimento debería aumentar cuando los parches varían en calidad y se agrupan los alimentos de alta calidad; (3) Si la distribución de los parches de alimento es el atributo principal que determina la competencia trófica, la competencia alimentaria debería aumentar cuando se agrupan los alimentos.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 *Estatutos Éticos*

La presente investigación cumplió con los requerimientos éticos y administrativos de la Ley Mexicana (aprobado por los permisos SEMARNAT SGPARN.03. VS.3644/11) y los Lineamientos para el Tratamiento de animales para investigación en comportamiento y enseñanza de la Asociación del Comportamiento Animal (Guidelines for the Use of Animals, 2018).

3.3.2 *Manejo de los individuos de estudio*

El presente estudio fue llevado a cabo con un grupo de monos araña que vive en la Unidad de Manejo Hilda Ávila de O’Farrill en Veracruz, México (18°28'–18°26' N, 95°03'–95°01' W). Este lugar es una reserva natural con aproximadamente 400ha que pertenece a la Universidad Veracruzana. Incluye áreas de selva alta y mediana perennifolia, así como la infraestructura necesaria para la realización de investigaciones acerca de la conducta y conservación de primates mexicanos confiscados del tráfico ilegal.

Los individuos bajo estudio vivían bajo condiciones de semilibertad en un encierro arbolado al aire libre de 1,800m² rodeado por una cerca eléctrica (Fig. 3.1) y por tanto expuestos a condiciones medioambientales naturales en cuanto a luz, temperatura y humedad relativa se refiere.



Figura 3.1 Instalaciones en semi-libertad. Sitio donde habitaban los individuos de estudio.

El grupo estaba compuesto de cinco individuos: 2 hembras adultas, 1 macho adulto, 1 macho juvenil y 1 hembra infante. Una hembra adulta y todos los individuos inmaduros nacieron en la misma reserva y fueron descendientes de la otra hembra adulta y el macho adulto.

Cada día a las 9:30 h, el grupo recibía los siguientes alimentos: 6 tomates rojos, media remolacha, 6 tallos de apio con hojas, 3 hojas de acelga, medio melón, media papaya, 1 aguacate, 3 zanahorias, medio brócoli, 30 plátanos, media piña, medio pepino y 6 manzanas. Todos los alimentos eran cortados antes de servir y se ofrecían a los individuos en una bandeja de alimentos de acero inoxidable (50 cm de largo x 30 cm de ancho x 15 cm de altura), que se levantaba con una cuerda y una roldana a lo alto de un árbol hasta aproximadamente los 8 metros (Fig. 3.2).



Figura 3.2 Bandeja de aprovisionamiento

3.3.3 Estudio Piloto

Durante un mes, habituamos al grupo a la presencia de 3 investigadores (30 días, aproximadamente 150 horas de observación). Aunque los individuos ya estaban completamente habituados a la presencia de personas en las áreas que rodean su recinto, la presencia humana dentro del recinto usualmente ocurría solo durante el periodo de alimentación. Por lo tanto, debido a que la recolección de muestras fecales requirió la entrada frecuente al recinto, realizamos esta adaptación para minimizar la probabilidad de representar un factor de estrés potencial para los monos. En cada día de observación, se ingresaba al recinto cuando uno de los sujetos defecaba y se realizaba la recolección de muestras fecales que se describe más adelante. Todas las muestras fecales recogidas durante las observaciones piloto se excluyeron de los análisis.

Durante las observaciones piloto, se determinó cuáles alimentos eran seleccionados preferentemente por los individuos al registrar ad libitum los alimentos que eran consumidos primero, y registrando qué alimentos se consumieron por completo (es decir, sin restos en la bandeja de alimentos o en el suelo). Con base en estas observaciones, se clasificó el aguacate, los plátanos, el pepino, los melones, las papayas, las

piñas y el tomate como *alimentos preferidos*, y la remolacha, el apio, las acelgas, las zanahorias, el brócoli y las manzanas como alimentos *no preferidos*.

Además, estas observaciones nos permitieron determinar que la actividad de alimentación generalmente disminuía dramáticamente 1 h después del aprovisionamiento. Después de este período, los individuos se alimentaban esporádicamente de los alimentos que permanecían y ocasionalmente se alimentaban de la vegetación natural dentro de su recinto.

3.3.4 Configuración experimental

Utilizamos cinco tratamientos experimentales y una condición neutra para la presentación de alimentos. Cada tratamiento representó una combinación particular de tamaño, distribución y calidad (definida como preferencia, como se describió anteriormente) de los alimentos (Tabla 3.1). Se colocaron bandejas de alimentos de manera que fuera posible observar a los sujetos durante el aprovisionamiento de alimentos sin barreras visuales. El tamaño de los parches para alimentos se manipuló presentando los alimentos en dos bandejas para alimentos de acero inoxidable de diferentes tamaños, una bandeja grande ($80 \times 40 \times 15$ cm) y una bandeja pequeña ($40 \times 30 \times 15$ cm). La distribución de alimentos se manipuló presentando los alimentos en una única bandeja (condición agrupada) o en dos bandejas (condición dispersa) separadas por 10 m. La calidad de los alimentos se manipuló presentando todos los alimentos en una o dos bandejas, o presentando alimentos de alta calidad en una bandeja diferente de alimentos de baja calidad. La condición neutral se presentó entre los tratamientos para aumentar la independencia de los datos conductuales y hormonales entre los tratamientos. En la condición neutral, los alimentos se presentaron a los sujetos como antes del inicio del estudio.

Cada tratamiento se repitió dos veces. Decidimos al azar el orden de los tratamientos asignando a cada tratamiento un número diferente y luego consultando una tabla de números aleatorios hasta que todos los números aparecieran dos veces. La secuencia resultante fue:

GA, PA, VDM, VDPG y VDPP (abreviaturas descritas en la Tabla 3-1). Con esta configuración minimizamos las probabilidades de que los individuos respondieran a una secuencia particular de tratamientos en lugar de a la variación en las características de las bandejas de alimentos, y así mismo, probar la consistencia dentro del tratamiento en los resultados conductuales y hormonales. Cada tratamiento se presentó al grupo durante 10 días consecutivos, seguidos de 4 días en tratamiento neutro.

Tabla 3.1 Tratamientos experimentales

Tratamiento	Características de presentación			Descripción
	tamaño	preferencia	distribución	
GA	grande	preferidos y no preferidos	agrupado	Bandeja grande con todo tipo de alimentos
PA	pequeña	preferidos y no preferidos	agrupado	Bandeja pequeña con todo tipo de alimentos
VDM	variable	preferidos y no preferidos	disperso	Bandeja grande y pequeña con todo tipo de alimentos
VDPG	variable	grande pequeña	preferidos y no preferidos	Bandeja grande con alimento preferido y Bandeja pequeña con alimento no preferido
VDPP	variable	grande pequeña	preferidos y no preferidos	Bandeja grande con alimento no preferido y Bandeja pequeña con alimento preferido

GA=grande, agrupado; PA=pequeña, agrupado; VDM= variable, disperso y mixto; VDPG= variable, disperso, con alimento preferido en bandeja grande; VDPP= variable, disperso, con alimento preferido en bandeja pequeña.

3.3.5 Observaciones conductuales

Todos los sujetos se identificaron en función de sus características anatómicas y fisionómicas naturales, como el tamaño corporal y las proporciones o la morfología y pigmentación genital. Durante cuatro meses, se realizaron observaciones conductuales. El muestreo de comportamiento comenzaba cuando la comida se presentaba a los monos, terminando 1 hora después. Para estudiar las interacciones sociales que ocurren en el contexto de la alimentación, muestreamos todos los episodios de conductas afiliativas y agonísticas con registro continuo (Altmann, 1974) (Tabla 3.2). Cuando ocurría una interacción social, se anotaba su tipo y la identidad tanto del actor como del receptor.

Para estudiar los patrones de proximidad de los individuos en el contexto de la alimentación, utilizamos un muestreo escaneado con registro instantáneo (Altmann, 1974). Cada 5 minutos se anotaba si cada individuo tenía otros miembros del grupo muy cerca (definido como <5 m). Simultáneamente, para estudiar la actividad de alimentación, durante el muestreo escaneado, registramos si los sujetos se alimentaban. Recolectamos un total de 100 h de datos de interacción social y 6,500 registros instantáneos de proximidad y actividad de alimentación (1,300 registros por individuo).

3.3.6 Colecta de muestras fecales, Procesamiento y Análisis

Las muestras fecales se recolectaron de forma oportunista a lo largo del día, siempre que se pudiera identificar a los individuos. Las muestras frescas no contaminadas con orina se recolectaron del piso y se depositaron en bolsas de polietileno etiquetadas con la identidad de cada individuo. Se recolectaron un total de 226 muestras fecales, con una media de (\pm SD) $44,8 \pm 1,3$ muestras por individuo. Se recogió una media de $45,2 \pm 5,4$ muestras por tratamiento. Se recolectaron muestras fecales de todos los individuos en todos los tratamientos.

Las muestras fecales se mantuvieron en una hielera con paquetes de gel congelados mientras estaban en el campo y posteriormente

guardadas al final del día en un congelador a una temperatura constante de -20°C . Las muestras se almacenaron durante un máximo de 12 meses hasta que se realizaron las extracciones. Este procedimiento de congelación utilizado para almacenar las muestras ha mostrado tener poco efecto sobre los metabolitos de hormonas fecales en otras especies de primates (Khan *et al.*, 2002).

Tabla 3.2 Interacciones sociales registradas en el presente estudio

Tipo de Interacción	Interacción	Descripción ^a
Afiliativa	Contacto	A se aproxima a R, y una parte de su cuerpo toca el cuerpo de R. Siempre por más de 5 segundos.
	Abrazo	A estira uno o ambos brazos en dirección a R y rodea su cuerpo. Este comportamiento puede ser recíproco.
	Aseo	A toca el cuerpo de R, y lenta y gentilmente escarba en su pelaje con ambas manos.
	Toque con mano	A toca a R con una o ambas manos. Se ha observado toque con mano hacia brazos, axilas, espalda, cara, pies, genitales, manos, cabeza, boca, cuello, hombros y cola del receptor. Siempre por menos de 5 segundos.
	Beso	A coloca sus labios contra el cuerpo de R. Se observaron besos a boca y cuello.
	Juego	A y R ejecutan movimientos rápidos dirigidos uno al otro que pueden incluir tocar, empujar, jalar, amago de morder y/o perseguir.
	Oler	A coloca su nariz cerca de alguna parte del cuerpo de R sin tocarlo y lo huele.
	Tocar con cola	A toca a R con su cola. Se observó tocamiento con cola hacia la espalda, manos, cabeza y cola de los receptores. Este contacto duró siempre menos de 5 segundos.
Agonístico	Perseguir	A corre hacia R, mientras R huye.
	Carga	A corre hacia el sitio ocupado por R. Como respuesta, R puede huir, retirar o ignorar el acercamiento de A.
	Amenaza	A observa insistentemente a R y puede hacer un movimiento repentino y/o agresivo hacia R. Normalmente acompañado de una vocalización.

^a A es actor, R es receptor.

Los metabolitos esteroides se extrajeron siguiendo una modificación del método descrito en Wasser *et al.* (2000). Brevemente, se agitaron 0,6 g de heces homogeneizadas, liofilizadas y pulverizadas durante 24 h en 6,0 ml de metanol de grado analítico. Los extractos se centrifugaron (460g durante 30 min a -4° C) y se recuperó el sobrenadante que contenía los esteroides. Después de completar la evaporación (a 60° C) del disolvente, los sedimentos se reconstituyeron con 3 ml de tampón de albúmina y se usaron para el análisis de MGCF. Los ensayos de MGCF se realizaron en el Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en la Ciudad de México. Los niveles de MGCF en todas las muestras se midieron utilizando un kit de cortisol de Radioinmunoanálisis ^{125}I comercial (Izotop, Institute of Isotopes Ltd., Budapest, Hungría; sensibilidad = 2.9 nmol / l; rango de calibración = 0–1,600 nmol / l) y un contador gamma (Cobra Modelo E5005, Packard Inc., Downers Grove, Illinois, EE. UU.). El fabricante informa de una baja reactividad cruzada con corticosterona (4,3%). Cuando se agregaron a los puntos de curva estándar, los extractos fecales agrupados, mostraron una precisión de $R_2 = 0,98$ ($n = 4$, $p < 0,001$). Las diluciones en serie de extractos fecales dieron curvas de desplazamiento paralelas a las obtenidas con el estándar de cortisol ($t = 1.01$, $p = 0.152$). Los coeficientes de variación intra e interensayo de los controles de alta y baja calidad fueron 7.5% (alto, $n = 12$) y 8.2% (bajo, $n = 12$), y 6.3% (alto, $n = 25$) y 12.1% (bajo, $n = 25$), respectivamente. Las concentraciones de hormonas se reportan como nanogramos por gramo de heces secas. Como una validación fisiológica de nuestro ensayo, determinamos el efecto a corto plazo de la captura (un factor estresante agudo) y la anestesia (ketamina) en el perfil de excreción de glucocorticoides fecales de dos monos araña adultos (1 macho y 1 hembra) que se alojaron por separado del grupo de estudio. Estos animales fueron capturados para el manejo veterinario, lo que brindó una oportunidad única para realizar la validación fisiológica. Se recolectaron todas las muestras fecales ($n = 15$) desde 48 h antes hasta 48 h después de la captura, y se compararon los niveles de pre-captura con las concentraciones post-captura con una prueba de Mann-Whitney. Los niveles de MGCF alcanzaron su punto máximo en una media (\pm

SD) de $18 \pm 2,3$ h después de la captura. Después de este resultado, para evaluar los efectos de los tratamientos en los niveles de MGCF, se utilizaron muestras fecales recolectadas entre el segundo día de cualquier tratamiento particular y el primer día en la condición neutral después de cada tratamiento.

Los niveles de MGCF post-captura (media \pm SD = 161.3 ± 130.5 ng/g) fueron significativamente más altos que los niveles de pre-captura (19.5 ± 16.7 ng / g; $Z = 3.18$, pre-captura $n = 6$, post-captura $n = 9$, $p < 0.001$), lo que indica que los ensayos de MGCF efectivamente midieron las respuestas suprarrenales de los monos araña a los factores estresantes.

No se encontraron diferencias en los niveles de MGCF entre las muestras recolectadas por la mañana (9: 00– 12:00 h) y por la tarde (12:00–17:00 h; prueba de Mann-Whitney $Z = 1.15$, mañana $n = 90$, tarde $n = 158$, $p = 0.257$). Por lo tanto, se analizaron todas las muestras fecales independientemente del momento de recolección.

3.3.7 *Análisis Estadísticos*

Se calculó la frecuencia total de las interacciones sociales afiliativas y agonísticas en cada tratamiento para cada individuo. La proximidad y la alimentación se analizaron como la proporción media de muestras instantáneas por hora por individuo en las cuales cada individuo tenía a otros miembros del grupo cerca o alimentándose, y se promediaron para cada tratamiento. Calculamos los niveles medios de MGCF por individuo por tratamiento para obtener una medida que reflejara la actividad hormonal individual en respuesta a la presentación del alimento.

Para evaluar los efectos de la presentación de los alimentos sobre el comportamiento y los MGCF de los monos araña, utilizamos modelos mixtos lineales generalizados (GLMM (Rabe-Hesketh *et al.*, 2005)). Ejecutamos un modelo para cada variable de respuesta (frecuencia de agonismo, frecuencia de afiliación, proximidad, actividad de alimentación y niveles de MGCF). Utilizamos modelos logísticos multinomiales (y funciones de enlace de identidad) para analizar las

interacciones sociales, ya que las frecuencias individuales de ambas interacciones, afiliativa y agonística, fueron bajas (rango de afiliación = 0-4 interacciones por individuo por tratamiento; rango de agonismo = 0-5). Los niveles de MGCF fueron transformados a la raíz cuadrada y se usó la transformación arcoseno tanto para la actividad de proximidad, como para la alimentación, para así lograr distribuciones normales. Se verificó que se cumplieran los supuestos de residuos distribuidos normalmente y homogéneos. La identidad de cada individuo se utilizó como factor aleatorio en todos los modelos. En cada modelo también se incluyeron réplicas anidadas dentro del tratamiento y sujetos anidados dentro del tratamiento como predictores categóricos para explicar la variación entre réplicas en las variables de respuesta registradas en cada turno y la variación entre sujetos en las variables de respuesta en cada tratamiento. Cuando el tratamiento tuvo un efecto significativo en una variable respuesta, se realizaron comparaciones post-hoc entre los tratamientos con GLMM ($n = 20$ casos). En estas pruebas, el tratamiento se incluyó como un factor fijo y la identidad individual se utilizó como un factor aleatorio.

Todos los análisis se realizaron con SPSS v.22.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., EE. UU.). El umbral estadístico se estableció en $p \leq 0.05$.

3.4 Resultados

Las estadísticas descriptivas para las variables respuesta se presentan en la Tabla 3.3. Las frecuencias de las interacciones sociales afiliativas y agonísticas, así como las proporciones de registros instantáneos en los que los individuos tenían otros miembros del grupo en proximidad no se vieron afectadas por el tratamiento (Tabla 3.4). En contraste, tanto la actividad de alimentación como los niveles de MGCF variaron significativamente en función del tratamiento. Los monos araña pasaron una menor proporción de tiempo de alimentación en el tratamiento PA que en los tratamientos VDM, VDPG y VDPP, y en el tratamiento GA que en los tratamientos VDPG y VDPP (todas las pruebas post hoc

GLMM $p < 0.05$; Tabla 3.3). En este modelo también hubo una variación significativa entre los individuos en el tiempo de alimentación dentro de los tratamientos (GA: $F_{4, 20} = 18.05$, $p < 0.001$; PA: $F_{4, 20} = 17.11$, $p < 0.001$; VDM: $F_{4, 20} = 9.51$, $p < 0.001$; VDPG: $F_{4, 20} = 5.57$, $p = 0.005$; VDPP: $F_{4, 20} = 6.91$, $p = 0.002$; tabla x). Los niveles de MGCF en los tratamientos GA y PA fueron significativamente más altos que en los tratamientos VDFM, VDPL y VDPS (todas las pruebas post hoc GLMM $p < 0.05$; Tabla 3.3).

3.5 Discusión

En el presente estudio examinamos cómo la competencia por recursos en monos araña en cautiverio se vio afectada por la variación a corto plazo en la disponibilidad de alimento. En particular, esperábamos que tanto el comportamiento como los niveles de glucocorticoides variaran en función de los cambios en el tamaño, la distribución y la calidad de los parches de alimento. Mientras que las interacciones sociales y los patrones de proximidad no se vieron afectados por la variación en la presentación de los alimentos, cuando los alimentos se concentraron, el tiempo dedicado a la alimentación disminuyó y los glucocorticoides aumentaron, en comparación con los tratamientos en los que se dispersó los alimentos. El tiempo dedicado a la alimentación también varió significativamente entre los individuos en las presentaciones de alimentos. Por lo tanto, nuestro estudio sugiere que la presentación de los alimentos, y específicamente la distribución de alimentos, puede ser un factor importante que determina el comportamiento y la respuesta fisiológica al estrés de monos araña en cautiverio.

Tabla 3.3 Estadísticos descriptivos (media \pm SD) para cada variable respuesta

Tratamiento	Afiliación	Agonismo	Proximidad	Alimentación	MGCF, ng/g
GA	1.8 \pm 1.3 (0.8)	1.2 \pm 0.9 (0.3)	0.6 \pm 0.2 (0.01)	0.4 \pm 0.3 (0.04)	67.8 \pm 24.5 (1.8)
PA	1.6 \pm 0.8 (0.8)	2.5 \pm 1.6 (0.4)	0.5 \pm 0.2 (0.07)	0.3 \pm 0.3 (0.02)	85.5 \pm 17.5 (9.7)
VDM	1.6 \pm 0.9 (0.6)	1.1 \pm 0.9 (0.1)	0.5 \pm 0.3 (0.05)	0.6 \pm 0.2 (0.06)	25.4 \pm 20.3 (10.6)
VDPG	1.6 \pm 0.9 (0.0)	0.9 \pm 0.8 (0.4)	0.5 \pm 0.2 (0.06)	0.6 \pm 0.1 (0.01)	29.7 \pm 23.1 (4.0)
VDPP	1.1 \pm 0.9 (0.9)	1.3 \pm 0.9 (0.4)	0.5 \pm 0.1 (0.07)	0.7 \pm 0.2 (0.06)	33.1 \pm 27.5 (14.6)

GA=grande, agrupado; PA=pequeña, agrupado; VDM= variable, disperso y mixto; VDPG= variable, disperso, con alimento preferido en bandeja grande; VDPP= variable, disperso, con alimento preferido en bandeja pequeña. La afiliación y el agonismo se calcularon como frecuencias medias por período focal (es decir, muestras de 1 hora). La proximidad y la alimentación se calcularon como la proporción media de muestras instantáneas por hora por individuo en las que cada individuo tenía otros miembros del grupo cerca o alimentándose, promediados para cada tratamiento. Las desviaciones estándar calculadas entre réplicas se presentan entre paréntesis.

Tabla 3.4 Resultados GLMM

	F	d.f.	p
Afiliación (modelo nulo)	0.57	29,17	0.908
Tratamiento	0.43	4,17	0.788
Replica (tratamiento)	1.65	5,17	0.200
Sujeto (tratamiento)	0.36	20,17	0.986
Agonismo	0.47	29,16	0.961
Tratamiento	1.45	4,16	0.265
Replica (tratamiento)	0.24	5,16	0.938
Sujeto (tratamiento)	0.352	20,16	0.985
Proximidad	1.46	29,20	0.193
Tratamiento	0.49	4,20	0.743
Replica (tratamiento)	1.28	5,20	0.311
Sujeto (tratamiento)	1.69	20,20	0.124
Alimentación	10.59	29,20	<0.001
Tratamiento	17.99	4,20	<0.001
Replica (tratamiento)	1.31	5,20	0.300
Sujeto (tratamiento)	11.43	20,20	<0.001
MGCF	2.81	29,20	0.010
Tratamiento	14.72	4,20	<0.001
Replica (tratamiento)	0.89	5,20	0.505
Sujeto (tratamiento)	0.91	20,20	0.583

Aunque algunos estudios reportan interacciones agresivas y desplazamientos agonísticos entre monos arañas salvajes en contextos de alimentación (Symington, 1987; Chapman, 1990), en general, la agresión es poco frecuente (Asensio *et al.*, 2008; Aureli & Schaffner, 2008; Slater *et al.*, 2009). Además, hay poca evidencia de la existencia de relaciones de dominancia (es decir, consistencia en los resultados de los conflictos agonísticos diádicos) tanto en poblaciones silvestres como en cautivas (Aureli & Schaffner, 2008). La frecuencia de las interacciones sociales y la proximidad entre los individuos no se vieron afectadas por la presentación de los alimentos, incluso cuando se agruparon. Sin embargo, los monos araña cambiaron su comportamiento en condiciones de alimento agrupado: el tiempo total de alimentación disminuyó; la variación en el tiempo de alimentación entre los individuos dentro de los tratamientos fue significativa para todas las presentaciones de alimentos, pero fue más marcada cuando estos se

agruparon. Aunque no se registraron cambios en la competencia de interferencia (es decir, interacciones conductuales entre competidores (Miller, 1967)) a lo largo del estudio, es posible que las diferencias entre los miembros del grupo en la prioridad de acceso a los alimentos permitieran a algunos individuos mantener sus tiempos de alimentación, pero no a otros. Por ejemplo, la hembra adulta que tuvo una cría mostró una baja variación en el tiempo de alimentación durante el estudio, mientras que el macho juvenil tuvo un tiempo de alimentación bajo cuando se agruparon los alimentos en comparación a cuando se dispersaron. Tales diferencias en la prioridad de acceso a los alimentos podrían explicarse por la deferencia de algunos individuos durante la alimentación, como se ha informado en otros primates (por ejemplo, lémures de cola anillada, *Lemur catta* (Kappeler, 1990)). Sin embargo, la disminución en la proporción de tiempo dedicado a la alimentación con alimentos agrupados se asoció a niveles generales más altos de MGCF, lo que sugiere que esta presentación de alimentos representó una situación estresante para todos los individuos. Por lo tanto, las diferencias entre los individuos en cuanto a la prioridad de acceso a los alimentos, incluso si no están acompañados por un comportamiento agresivo, podrían reflejar una mayor competencia por el alimento. Para los individuos con prioridad en acceso a los alimentos, los niveles más altos de MGCF podrían reflejar los efectos de los desafíos físicos asociados con los cambios en el comportamiento dirigidos a defender los recursos alimenticios (por ejemplo, vigilancia), y para todos los individuos el riesgo percibido de tener que desalojar o ser expulsados de las bandejas de alimentos pudieron haber representado un factor estresante psicosocial significativo (Creel, 2001; Abbott *et al.*, 2003). Además, para una especie que se enfrenta a la competencia por alimentos ajustando el tamaño del subgrupo a la abundancia de alimentos (Asensio *et al.*, 2008), podría ser particularmente difícil lidiar con los recursos alimenticios agrupados cuando los individuos no pueden emplear sus estrategias normales de división en subgrupos. Por lo tanto, en especies que no compiten agresivamente por los alimentos, como los monos araña, la acumulación de recursos alimenticios puede

llevar a la aparición de diferencias interindividuales en la actividad de alimentación y resultar en estrés fisiológico.

Aunque este fue un estudio a corto plazo, los monos araña presentaron respuestas fisiológicas muy inmediatas a los cambios en su entorno. Los cambios en los MGCF se documentaron desde el primer tratamiento, como lo demuestra la diferencia significativa entre los tratamientos VDM (distribución dispersa) y GA (distribución agrupada). Estos cambios también fueron muy consistentes a lo largo del estudio, porque la variación en los niveles hormonales entre las repeticiones en cada tratamiento y entre los individuos en cada tratamiento no fue significativa. La variación observada en los niveles de MGCF durante el estudio sugiere que los individuos pudieron mostrar respuestas glucocorticoides saludables a los desafíos impuestos por nuestra configuración experimental, pero también que la presentación de alimento tal vez no sea un factor estresante tan fuerte como para provocar estrés crónico (Wingfield *et al.*, 1998; Sapolsky *et al.*, 2000) en monos araña cautivos. La modulación de los glucocorticoides es parte de la respuesta al estrés fisiológico adaptativo, y estas hormonas están involucradas en diversas acciones (Sapolsky *et al.*, 2000). Antes del inicio de nuestro estudio, los alimentos se habían ofrecido al grupo en una presentación agrupada durante muchos años. Si esa presentación representara un factor estresante lo suficientemente fuerte y prolongado como para inducir una respuesta de estrés crónico, no esperaríamos que los individuos presenten una variación en los niveles de MGCF en respuesta a nuestra configuración experimental, o tal variación no debería ser consistente durante todo el estudio (por ejemplo, individuos que responden a cambios en la presentación de alimentos en lugar de a variaciones en las características de los parches de alimentos).

Hay varias implicaciones de nuestros resultados para el manejo de monos araña en cautividad. Primero, en contraste con la mayoría de los zoológicos, los monos araña de nuestro estudio: (1) nunca están expuestos a un gran número de personas que no les son familiares; (2) puede evitar el contacto con humanos debido al tamaño del recinto y la vegetación presente en él; (3) no son capturados para procedimientos veterinarios de rutina; (4) están expuestos a condiciones ambientales

naturales relacionadas con la temperatura ambiente, la humedad relativa y la luz. En los zoológicos, estos atributos del ambiente en cautividad tienen un efecto positivo en el bienestar de los individuos (Hosey, 2005; Morgan & Tromborg, 2007; Mason, 2010). El hecho de que los individuos presentaran cambios significativos en su comportamiento y estrés fisiológico en respuesta a la variación en la presentación de los alimentos sugiere que los entornos naturalistas en cautiverio y las prácticas de manejo de baja intensidad no son suficientes para asegurar el bienestar de los monos araña. En segundo lugar, el comportamiento agresivo entre los miembros del grupo no se vio afectado por la variación en la presentación de los alimentos, incluso cuando éstos se agruparon. Por lo tanto, nuestro estudio articularía con un análisis previo del comportamiento agresivo entre monos araña en cautiverio para descartar la competencia por alimento como un factor importante asociado con la aparición de agonismo que pueda provocar lesiones o la muerte de los individuos (Davis *et al.*, 2009). Finalmente, también manipulamos experimentalmente la disponibilidad espacial del alimento cuando no existía una variación temporal en la presentación de dichos alimentos. Nuestros resultados indican que cuando los alimentos se presentan solo una vez durante el día, los alimentos dispersos pueden ser suficientes para limitar la aparición de competencia trófica. En este sentido, enfatizamos que agregar una segunda bandeja / estación de alimentación, cuando solo hay una presente, puede no representar un aumento significativo en el esfuerzo de manejo, pero mejorará el bienestar de los individuos.

3.6 Referencias

- Abbott DH, Keverne EB, Bercovitch FB, Shively CA, Mendoza SP, Saltzman W, Snowdon CT, Ziegler TE, Banjevic M, Garland T & Sapolsky RM (2003). Are subordinates always stressed? A comparative analysis of rank differences in cortisol levels among primates. *Hormones and Behavior* 43: 67–82.
- Alexander RD (1974). The evolution of social behavior. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5: 325–383.
- Altmann J (1974). Observational study of behavior: sampling methods. *Behaviour* 49: 227–267.
- Anderson JR & Chamove AS (1984). Allowing captive primates to forage. En: Standards in Laboratory Animal Management. Symposium Proceedings, vol 2, p 253–256. Potters Bar, Universities Federation for Animal Welfare.
- Asa CS, Marshall F & Fischer M (2012). Affiliative and aggressive behavior in a group of female Somali wild ass (*Equus africanus somalicus*). *Zoo Biology* 31: 87–97.
- Asensio N, Korstjens AH, Schaffner CM & Aureli F (2008). Intragroup aggression, fission-fusion dynamics and feeding competition in spider monkeys. *Behaviour* 145: 983–1001.
- Aureli F & de Waal FBM (2000). Natural Conflict Resolution. Berkeley, University of California Press.
- & Schaffner CM (2008). Social interactions, social relationships and the social system of spider monkeys. En: *Spider Monkeys: The Biology, Behavior and Ecology of the Genus Ateles* (Campbell CJ, ed.), p 236–265. Cambridge, Cambridge University Press.
- , Schaffner CM, Boesch C, Bearder SK, Call J, Chapman CA, Connor R, Di Fiore A, Dunbar RIM, Henzi SP, Holekamp K, Korstjens A, Layton R, Lee P, Lehmann J, Manson JH, Ramos-Fernández G, Strier KB & van Schaik CP (2008). Fission-fusion dynamics: new research frameworks. *Current Anthropology* 49: 627–654.

- Blanckenhorn WU, Grant JWA & Fairbairn DJ (1998). Monopolization in a resource queue: water striders competing for food and mates. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 42: 63–70.
- Boesch C & Boesch-Achermann H (2000). The Chimpanzees of the Tai Forest. Oxford, Oxford University Press.
- Britt A (1998). Encouraging natural feeding behaviour in captive-bred black and white ruffed lemurs (*Varecia variegata variegata*). *Zoo Biology* 17: 379–392.
- Chapman CA (1990). Association patterns of spider monkeys: the influence of ecology and sex on social organization. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 26: 409–414.
- _____ & Chapman LJ (2000). Determinants of group size in social primates: the importance of travel costs. En: On the Move: How and Why Animals Travel in Groups (Boinski SP, Garber A, Eds.), p 24–42. Chicago, University of Chicago Press.
- _____, Wrangham RW & Chapman LJ (1995). Ecological constraints on group size: an analysis of spider monkey and chimpanzee subgroups. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 36: 59–70.
- Creel S (2001). Social dominance and stress hormones. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 491–497.
- Davis N, Schaffner CM & Wehnelt S (2009). Patterns of injury in zoo-housed spider monkeys: a problem with males? *Applied Animal Behaviour Science* 116: 250–259.
- De Jong IC, Sgoifo A, Lambooi E, Korte SM, Blokhuis HJ & Koolhaas JM (2000). Effects of social stress on heart rate and heart rate variability in growing pigs. *Canadian Journal of Animal Science* 80: 273–280.
- Di Fiore A & Campbell CJ (2007). The atelines: variation in ecology, behaviour and social organization. En: *Primates in Perspective* (Campbell CJ, Fuentes A, Mackinnon KC, Panger M, Bearder SK, Eds.), p 155–185. New York, Oxford University Press.
- Fedigan LM & Baxter MJ (1984). Sex differences and social organization in free-ranging spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). *Primates* 25: 279–294.

- Forthman DL, Elder SD, Bakeman R, Kurkowski TW, Noble CC & Winslow SW (1992). Effects of feeding enrichment on behavior of three species of captive bears. *Zoo Biology* 11: 187–195.
- Gil-Burmann C, Peláez F & Sánchez S (1998). Variations in competitive mechanisms of captive male hamadryas-like baboons in two feeding situations. *Primates* 39: 473–484.
- Goldberg JL, Grant JWA & Lefebvre L (2001). Effects of temporal predictability and spatial clumping of food on the intensity of competitive aggression in the Zenaida dove. *Behavioral Ecology* 12: 490–495.
- Goss-Custard JD, Clarke RT & Durell SEAV (1984). Rates of food intake and aggression of the oystercatchers *Haematopus ostralegus* on the most and least preferred mussel *Mytilus edulis* beds of the Exe estuary. *Journal of Animal Ecology* 53: 233–245.
- Grant JWA, Gaboury CL & Levitt HL (2000). Competitor-to-resource ratio, a general formulation of operational sex ratio, as a predictor of competitive aggression in Japanese medaka (Pisces: *Oryziidae*). *Behavioral Ecology* 11: 670–675.
- Grenier D, Barrette C & Crête M (1999). Food access by white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) at winter feeding sites in eastern Québec. *Applied Animal Behaviour Science* 63: 323–337.
- Höhn M, Kronschnabl M & Ganslosser U (2000). Similarities and differences in activities and agonistic behavior of male eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*) in captivity and the wild. *Zoo Biology* 6: 529–539.
- Hosey G (2005). How does the zoo environment affect the behaviour of captive primates? *Applied Animal Behaviour Science* 90: 107–129.
- Kappeler PM (1990). Female dominance in *Lemur catta*: more than just female feeding priority? *Folia Primatologica* 55: 92–95.
- Kawata K (2008). Zoo animal feeding: a natural history viewpoint. *Der Zoologische Garten* 78: 17–42.
- Kerridge FJ (2005). Environmental enrichment to address behavioral differences between wild and captive black-and-white ruffed lemurs (*Varecia variegata*). *American Journal of Primatology* 66: 71–78.

- Khan MZ, Altmann J, Isani SS & Yu J (2002). A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. *General and Comparative Endocrinology* 128: 57–64.
- Krause J & Ruxton GD (2002). *Living in Groups*. Oxford, Oxford University Press.
- Lukas KE (1999). A review of nutritional and motivational factors contributing to the performance of regurgitation and reingestion in captive lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *Applied Animal Behaviour Science* 63: 237–249.
- Mason GJ (2010). Species differences in responses to captivity: stress, welfare and the comparative method. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 713–721.
- Mathy JW & Isbell LA (2001). The relative importance of size of food and interfood distance in eliciting aggression in captive rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Folia Primatologica* 72: 268–277.
- Miller RS (1967). Pattern and process in competition. *Advances in Ecological Research* 4: 1–74.
- Morgan KN & Tromborg CT (2007). Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science* 102:262–302.
- Pastor-Nieto R (2001). Grooming, kinship, and co-feeding in captive spider monkeys (*Ateles geoffroyi*) *Zoo Biology* 20: 293–303.
- Rabe-Hesketh S, Skrondal A & Pickles A (2005). Maximum likelihood estimation of limited and discrete dependent variable models with nested random effects. *Journal of Econometrics* 128: 301–323.
- Sapolsky RM, Romero LM & Munck AU (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? *Endocrinology Reviews* 21: 55–89.
- Shimooka Y, Campbell C, Di Fiore A, Felton AM, Izawa K, Link A, Nishimura A, Ramos-Fernandez G & Wallace RB (2008). Demography and group composition of *Ateles*. En: *Spider Monkeys: The Biology, Behavior and Ecology of the Genus Ateles* (Campbell CJ, ed.), p 329–350. Cambridge, Cambridge University Press.
- Shyne A (2006). Meta-analytic review of the effects of enrichment on stereotypic behavior in zoo mammals. *Zoo Biology* 4: 317–337.

- Sistema Internacional de Identificación de Especies [International Species Identification System, ISIS] (2015). Species holdings. <http://www.isis.org>.
- Slater KY, Schaffner CM & Aureli F (2009). Sex differences in the social behavior of wild spider monkeys (*Ateles geoffroyi yucatanensis*). *American Journal of Primatology* 71: 21–29.
- Stahl D & Kaumanns W (2003). Food competition in captive female sooty mangabeys (*Cercocebus torquatus*). *Primates* 44: 203–216.
- Sterck EHM, Watts DP & van Schaik CP (1997). The evolution of female social relationships in nonhuman primates. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 41: 291–309.
- Swaigood RR & Shepherdson DJ (2005). Scientific approaches to enrichment and stereotypes in zoo animals: what's been done and where should we go next? *Zoo Biology* 24: 499–518.
- Symington MM (1987). Sex ratio and maternal rank in wild spider monkeys: when daughters disperse. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 20: 421–425.
- , (1990). Fission-fusion social organization in *Ateles* and *Pan*. *International Journal of Primatology* 11: 47–61.
- Van Roosmalen MGM & Klein LL (1988). The spider monkeys, genus *Ateles*. En: Ecology and Behaviour of Neotropical Primates (Mittermeier RA, Rylands AB, Coimbra-Filho AF, da Fonseca GAB, Eds.), p 455–537. Washington, World Wildlife Fund.
- Van Schaik CP (1989). The ecology of social relationships amongst female primates. En: Comparative Socioecology of Mammals and Humans (Standen V, Foley RA, eds.), p 195–218. Oxford, Blackwell.
- , Terborgh J & Wright SJ (1993). The phenology of tropical forests: adaptive significance and consequences for primary consumers. *Annual Review of Ecology and Systematics* 23: 353–377.
- Wasser SK, Hunt KE, Brown JL, Cooper K, Crockett CM, Bechert U, Millspaugh JJ, Larson S & Monfort SL (2000). A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology* 120: 260–275.

- Weir LK & Grant JWA (2004). The causes of resource monopolization: interaction between resource dispersion and mode of competition. *Ethology* 110: 63–74.
- Whitham JC & Wielebnowski N (2013). New directions for zoo animal welfare science. *Applied Animal Behaviour Science* 147: 247–260.
- Wingfield JC, Maney DL, Breuner CW, Jacobs JD, Lynn S, Ramenofsky M & Richardson RD (1998). Ecological bases of hormone-behavior interactions: the ‘emergency life history stage’. *American Zoologist* 38: 191–206.
- Wrangham RW (1980). An ecological model of female bonded primate groups. *Behaviour* 75: 262–300.
- Young RJ (1997). The importance of food presentation for animal welfare and conservation. *Proceedings of the Nutrition Society* 56: 1095–1104.

Capítulo 4

Partición de nichos isotópicos en dos especies simpátricas de monos aulladores

Parte de este capítulo está bajo revisión como:

Elizabeth Flores-Escobar, Carolina Sanpera, Lluís Jover, Liliana Cortés-Ortiz, Ariadna Rangel-Negrín, Domingo Canales-Espinosa & Pedro Américo D. Dias. **Isotopic niche partitioning in two sympatric howler monkey species.** Enviado a American Journal of Physical Anthropology (2019).

4.1 Resumen

La similitud ecológica entre especies puede conducir a una competencia trófica interespecífica. Sin embargo, cuando coexisten especies ecológicamente similares, pueden diferir en estrategias de búsqueda de alimento y uso del hábitat, lo que puede conducir a una partición de nicho. En la presente Tesis, se midió la amplitud del nicho isotópico, que es un proxy de la amplitud del nicho trófico, en monos aulladores de manto (*Alouatta palliata*) y negros (*A. pigra*) en alopatria y simpatria, se evaluó si presentaban partición de nicho utilizando mediciones isotópicas en pelo y se estimó el grado de solapamiento entre las diferentes condiciones, así como de ambas especies en el área de simpatria. Entre 2008 y 2012, se recolectaron muestras de pelo de 203 individuos (115 de monos aulladores negros y 88 de monos aulladores de manto) y se utilizó espectrometría de masas con relación de isótopos de flujo continuo para estimar $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$. Se describió la amplitud del nicho isotópico de cada especie en cada condición (es decir, alopatria y simpatria) a través de la estimación bayesiana de las áreas de elipse de desviación estándar. En alopatria, la amplitud del nicho isotópico y la variación isotópica fueron similares en ambas especies. En simpatria, los monos aulladores negros tuvieron un nicho isotópico significativamente más amplio, que estaba determinado principalmente por los altos valores de $\delta^{15}\text{N}$, e incluía la mayor parte del nicho isotópico de los monos aulladores de manto. El nicho isotópico de los monos aulladores de manto no fue diferente entre simpatria y alopatria. Las métricas de diversidad isotópica demostraron que, a pesar de compartir la misma área, cada especie presenta diferente forma y tamaño de nicho isotópico en el área donde convergen ambas especies. La coexistencia de estas especies ecológicamente similares está vinculada a ajustes de nicho trófico por una especie, sin embargo, las características particulares de dichos ajustes (por ejemplo, partición dietética, espacial o sensorial) aún no se han abordado.

Palabras clave: *Alouatta*, coexistencia, área de elipse de desviación estándar, simpatria, nicho trófico.

4.2 Introducción

La interacción entre individuos de diferentes especies en una comunidad puede conducir a la competencia por recursos limitados (Pianka 1981). En general, cuanto más ecológicamente similares sean dos especies, más probable es que la competencia entre ellas sea intensa, aunque la intensidad de la competencia variará de acuerdo con las especies involucradas, el tamaño de las poblaciones que interactúan, la variación del nicho interindividual, y la abundancia de recursos (Araújo *et al.*, 2011; Dammhahn & Kappeler 2014; Davies *et al.*, 2007). La competencia interespecífica intensa puede eventualmente derivar en la exclusión de una especie (Wisheu 1998). Aun así, es común encontrar especies ecológicamente similares que viven juntas en la misma comunidad (Dayan & Simberloff 2005), lo que indica que existen estrategias que permiten la coexistencia (Chase & Leibold 2003).

La partición de recursos minimiza la competencia interespecífica y permite la coexistencia de especies (Schoener 1974). La partición de recursos generalmente se basa en la segregación en una o varias dimensiones del nicho de las especies (n-hipervolumen *sensu* Hutchinson 1957), incluidas las dimensiones temporales, espaciales y tróficas. Dada la influencia directa del consumo de alimentos en los parámetros de la eficacia biológica (e.g., Grant & Grant 2002), se puede esperar que las estrategias que permitan la segregación de nichos tróficos estén bajo una fuerte presión selectiva y, por lo tanto, su estudio puede contribuir con información crítica para comprender la coexistencia de especies. Las especies simpátricas pueden segregar sus nichos tróficos alimentándose de diferentes alimentos, o en diferentes lugares u horarios (López-Bao *et al.*, 2016; Steinmetz *et al.*, 2011; Vanak *et al.*, 2013; Vernes 2003). Sin embargo, la segregación trófica estará supeditada a la disponibilidad de recursos, de modo que la alta estacionalidad en la abundancia de alimentos o la escasez de estos provocada por la actividad humana puede conducir a un mayor solapamiento de nichos tróficos (Kuhnen *et al.*, 2017).

Los tejidos corporales de los consumidores contienen una firma isotópica estable que refleja la composición isotópica de su dieta (Hobson & Clark 1992; Hobson 1999). Por lo tanto, el análisis de isótopos estables permite investigar la ecología trófica de individuos en libertad (Crawford *et al.*, 2008; Newsome *et al.*, 2007). La proporción de isótopos estables de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) aporta información principalmente sobre la dieta y el uso del hábitat, mientras que la proporción de nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) es una representación de la posición trófica (Crawford *et al.*, 2008; Newsome *et al.*, 2007). Combinados, representan una aproximación del nicho isotópico, que proporciona información cuantitativa sobre dos de las principales características de los nichos tróficos: amplitud del nicho (es decir, uso del hábitat) y posición del nicho (es decir, el lugar de la población en la red trófica; Bearhop *et al.*, 2004; Newsome *et al.*, 2007; Turner *et al.*, 2010). Los tejidos inertes, como el pelo, son particularmente útiles para el análisis de isótopos estables, ya que su composición isotópica revela los valores isotópicos de la dieta en el momento de la síntesis del tejido (Oelze, 2016). Además, dado que la incorporación de isótopos en el pelo se produce durante varios días o meses, y debido a que no se produce recambio después de la deposición de isótopos, la firma isotópica del pelo permite transmitir información sobre la dieta del individuo durante un largo período de tiempo y este registro puede conservarse indefinidamente (Ayliffe *et al.*, 2004; Ben-David & Flaherty, 2012).

Los primates, tanto extintos como existentes, son un buen modelo para explorar la coexistencia de especies porque las comunidades de primates generalmente incluyen varios taxones y con frecuencia se encuentran especies ecológicamente similares viviendo en simpatria (por ejemplo, Deane *et al.*, 2013; Ganzhorn *et al.*, 1999; Peres & Janson, 1999). Tal es el caso de los monos aulladores (género *Alouatta*). Los monos aulladores son una radiación neotropical de primates que incluye 12 especies (Cortes-Ortiz *et al.*, 2015a). Todas las especies son diurnas, arbóreas, viven en grupos sociales y tienen una dieta frugívora-folívora (Kowalewski *et al.*, 2015a, b). Se han descrito varias zonas de contacto entre especies a lo largo de su rango de distribución (Cortes-Ortiz *et al.*, 2015b). En particular, los monos

aulladores de manto (*A. palliata*) y negro (*A. pigra*) viven en simpatría en el sur de México (Cortés-Ortiz *et al.*, 2015b). En alopatría, ambas especies tienen dietas que se ajustan al patrón típico de frugivoría-folivoría observado en el género, pasan más tiempo alimentándose de las hojas que de las frutas y consumen aproximadamente el 20% y el 50% de las mismas especies de plantas y familias, respectivamente (Dias & Rangel-Negrín, 2015). Por lo tanto, los monos aulladores de manto y negros representan un modelo adecuado para explorar las respuestas de especies ecológicamente similares a la competencia trófica interespecífica.

El objetivo de este estudio fue investigar la variación en el nicho trófico de los monos aulladores de manto y negros entre las condiciones de alopatría y simpatría haciendo mediciones bivariadas $\delta^{13}\text{C}$ x $\delta^{15}\text{N}$ de su nicho isotópico. Dada la ausencia de jerarquía alimentaria en ambas especies, no se esperaron diferencias en los valores de isótopos vinculadas al sexo de los individuos. Se examinaron dos hipótesis. La primera planteaba que, dada su similitud ecológica, el nicho trófico de ambas especies debería ser similar en alopatría. Se probaron dos predicciones de esta hipótesis: 1) ambas especies deberían tener rangos similares de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, 2) ambas especies deberían tener amplitud de nichos isotópicos similares. Como las poblaciones alopátricas viven en diferentes condiciones climáticas y de vegetación (ver Material y Métodos), que son factores que pueden afectar los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ (e.g., Ambrose, 1991; Codron *et al.*, 2013a; Craine *et al.*, 2009; Diefendorf *et al.*, 2010; Ehleringer *et al.*, 1986; Ehleringer & Cooper, 1988; Farquhar *et al.*, 1989; Heaton, 1987; Kohn, 2010; Martinelli *et al.*, 1999 ; Swap *et al.*, 2004; Szpak *et al.*, 2013; van der Merwe & Medina, 1991), se esperaba que los nichos isotópicos no se superpongan significativamente entre las poblaciones alopátricas. En segundo lugar, se planteó la hipótesis de que el nicho trófico de ambas especies debería divergir en simpatría, lo que indicaría una partición del nicho. Las predicciones fueron las siguientes: 1) ambas especies presentarían rangos similares de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, 2) ambas especies abarcarían amplitudes de nicho isotópico similares, 3) los nichos isotópicos no deben solaparse significativamente, lo que indicaría que los individuos explotan los

recursos alimenticios de manera diferente. En otras palabras, se esperaban los mismos atributos de nichos isotópicos en ambas especies en ambas condiciones, pero mientras que en alopatría esta similitud sería una consecuencia de la variación ambiental (efectos climáticos y de vegetación en las firmas isotópicas), en simpatría estaría asociada a la partición de nicho.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 *Nota ética*

Este estudio se adhirió a los principios de la Sociedad Americana de Primatólogos (ASP) para el tratamiento ético de los primates no humanos. El Comité para el uso y cuidado de animales de la Universidad de Michigan (UCUCA) aprobó los protocolos utilizados para el manejo de animales y la recolección de muestras (permiso # 09319). Los permisos para la recolección y el transporte de muestras fueron proporcionados por autoridades mexicanas (SGPA /DGVS/03676/07, SGPA /DGVS/06116, SGPA /DGVS/03293/10, SGPA /DGVS/10637/11 y CITES MX 74679), guatemaltecas (CESA /mam/Exp.7739) y españolas (ES-BB-00038-15I). Este estudio cumplió con los requisitos legales de la ley mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010).

4.3.2 *Sitios de estudio*

El estudio se realizó en el sureste de México y Guatemala (Fig. 4.1). La condición alopática de los monos aulladores de manto se localizó en el estado de Veracruz (Los Tuxtlas), donde se tomaron muestras de dos grupos. La condición alopática de los monos aulladores negros se localizó en el estado de Campeche (México; ocho grupos) y en El Petén (Guatemala; un grupo). La condición de simpatría se localizó en el estado de Tabasco (área de Macuspana, México), donde tomamos muestras de 25 grupos.

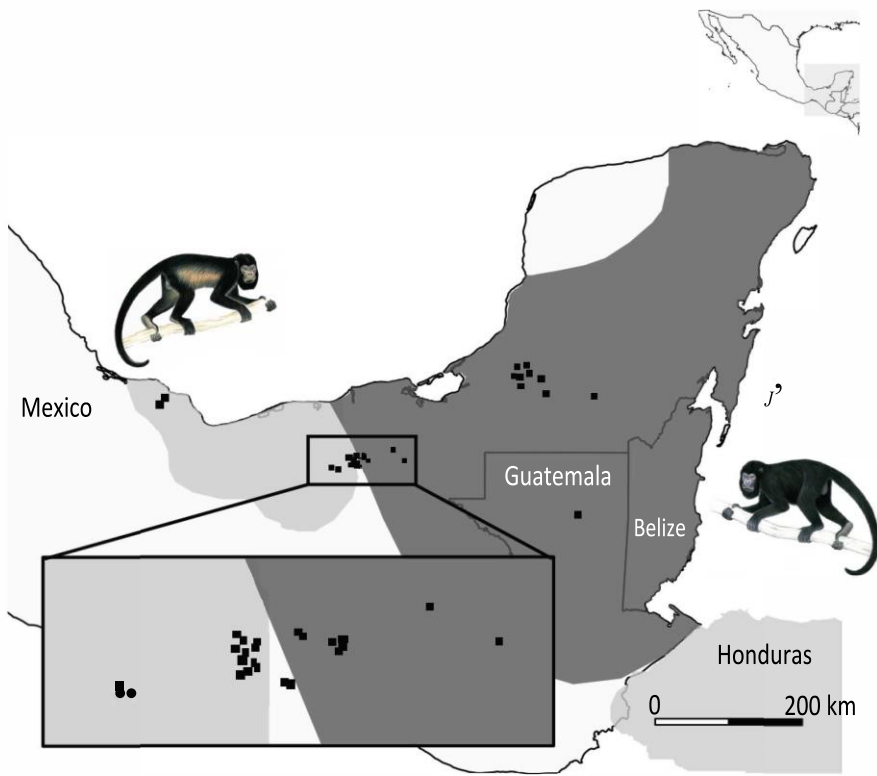


Figura 4.1 Ubicación de los grupos muestreados. Rango de distribución de los monos aulladores de manto (*Alouatta palliata*, gris claro) y negro (*Alouatta pigra*, gris oscuro). Los cuadrados negros representan ubicaciones de grupos. El recuadro es un zoom de grupos muestreados en la condición de simpatria. (Ilustraciones de primates: Stephen Nash).

Algunos individuos en el área de simpatria están cruza debido a la hibridación (Cortés-Ortiz *et al.*, 2007, 2019). Sin embargo, los individuos cruzados son producto de generaciones múltiples de cruza entre individuos híbridos e individuos de especies parentales (Cortés *et al.*, 2019) y su morfología (Kelaita *et al.*, 2011) coincide con su comportamiento (es decir, los individuos que lucen como *A. palliata*, se comportan como monos aulladores de manto, y los individuos con rasgos fenotípicos de *A. pigra*, se comportan como monos aulladores

negros: Ho *et al.*, 2014; Kitchen *et al.*, 2017). Por lo tanto, para este estudio identificamos individuos como monos aulladores de manto o negros según su morfología.

El clima en todas las condiciones es tropical, con variaciones en la precipitación anual. En todas las condiciones hay estacionalidad en las precipitaciones, con una estación seca que ocurre entre los meses de enero a mayo. Aunque la perturbación humana ha resultado en un reemplazo significativo de la vegetación original por campos agrícolas y otros usos antrópicos de la tierra en todo el sur de México (Sánchez-Colón *et al.*, 2009), todos nuestros sitios de estudio se ubicaron en el bioma "Bosques húmedos de hoja ancha tropicales y subtropicales" (WWF, 2019).

4.3.2.1 Tabasco

Tabasco es un estado cálido y húmedo ubicado en el sureste de México. Durante el período de muestreo, mostró una precipitación media anual que varió de 2,069.7 a 2,617.3 mm (SMN, 2017). La temperatura media anual fue de 26.1°C (máx. 31.2° y 20.8°C mín.). La zona donde se realizaron las capturas pertenece a la ecorregión "Bosques húmedos Petén-Veracruz" (WWF, 2019).

En este estudio, la mayoría de las muestras ($N = 142$) pertenecen a individuos capturados en remanentes de bosque en Tabasco, donde coexisten las especies *A. pigra* y *A. palliata* (Cortés-Ortiz *et al.*, 2007). De todas las regiones estudiadas, Tabasco es la más afectada por la alteración del hábitat. El tipo de vegetación dominante original en esta región solía ser grandes áreas de bosque tropical semiperenne y perenne (Rzedowski 2006), pero se ha fragmentado severamente durante los últimos años. Actualmente, los bosques restantes en Tabasco se encuentran en un paisaje de pastizales, ranchos ganaderos privados, tierras de cultivo y pueblos (Sánchez-Colón *et al.* 2009). Las poblaciones de aulladores que viven aquí están aisladas en archipiélagos de parches de bosques principalmente secundarios que varían en tamaño, calidad de hábitat y distancias de aislamiento a otros remanentes de bosque. Ocasionalmente, varios grupos de monos

aulladores (hasta tres en el estudio actual; ver Anexo 2) podrían residir en un solo parche de bosque simultáneamente. Con frecuencia, se encuentran grupos de ambas especies muy cerca, y en ocasiones incluso descansando o alimentándose del mismo árbol a la vez, lo que a veces da lugar a casos de hibridación entre ellos (Dias *et al.*, 2013).

En esta área, es más probable que ocurran consecuencias negativas derivadas de los asentamientos humanos que en áreas más preservadas. Estos incluyen: registro, contacto visual y/o acústico con personas y depredación por perros domésticos cuando se mueven a parches circundantes en busca de fuentes de alimentos adicionales (Rangel-Negrín *et al.*, 2011).

4.3.2.2 Campeche

La región de Campeche también tiene un clima subtropical cálido, con un conjunto de precipitaciones anuales de 1,425.2 a 1,560.0 mm durante el período de muestreo y una temperatura promedio anual de 26.3°C, con un promedio máximo y mínimo de 32.5° y 20.2° C, respectivamente (SMN, 2017). La zona donde se realizaron las capturas pertenece a la ecorregión “Bosques húmedos de Yucatán” (WWF, 2019).

Aunque las actividades humanas ocurren en esta región, los monos aulladores se enfrentan a estresores antropogénicos bajos dentro de un área forestal relativamente bien conservada, donde los tipos de vegetación dominantes son bosques estacionales semi-caducifolios y de hoja perenne (Miranda & Fernández, 1963). Los ocho grupos de *A. pigra* capturados en esta región se distribuyen en áreas separadas, excepto dos de ellos que habitan en la Reserva Forestal El Tormento, aunque no se observó que sus áreas de distribución se superpongan y en realidad están separadas por una carretera. Esta reserva es un área protegida y relativamente grande de bosque tropical primario de aproximadamente 1,400 ha (Van Belle & Estrada, 2008). La Reserva de la Biosfera de Calakmul representa la mayor área de bosque tropical en México y la principal región de bosque tropical en América del Norte, siendo parte del Corredor Biológico Mesoamericano. La reserva cubre 723,185 ha y

presenta tipos de vegetación semi-caducifolia alta (> 30 m), mediana (15 a 25 m) y corta (4 a 15 m) (Arriaga *et al.*, 2000).

Por otro lado, Chicbul es un área relativamente pequeña de 5 ha que muestra un bosque semi-caducifolio bajo y medio. Está ubicado en un paisaje altamente humanizado, donde la mayor parte de su hábitat original se ha convertido en tierra agrícola, a solo 320 m del pueblo más cercano (Rangel-Negrín *et al.*, 2014); por lo tanto, el grupo aullador que habita esta región vive bajo estresores antropogénicos descritos anteriormente.

4.3.2.3 Veracruz

El clima es cálido subtropical, mostrando una temperatura media anual de 22.9°C con un promedio máximo y mínimo de 28.1° y 17.8 C, respectivamente. La precipitación media anual durante el período de muestreo fue de 1.695,9 mm (SMN, 2017). La zona donde se realizaron las capturas pertenece a la ecorregión “Sierra de Los Tuxtlas” (WWF, 2019).

El estado de Veracruz representa el límite más septentrional para la distribución del género *Alouatta* en el continente americano (Estrada & Coates-Estrada, 1988). En esta región, fueron capturados dos grupos de *A. palliata*. Uno en La Flor y el segundo en Jalapilla.

La Flor, Catemaco (~ 120 ha) es una plantación de palma ornamental que consiste en vegetación primaria y secundaria. El dosel está compuesto de especies arbóreas típicas de la selva primaria no perturbada y los monos aulladores arbóreos pueden moverse libremente a través de los árboles. Por lo tanto, La Flor constituye un sitio prácticamente tranquilo, a pesar de la cosecha diaria de palmeras ornamentales en el sotobosque (Ho *et al.*, 2014).

El grupo restante de *A. palliata* está en Rancho Jalapilla, Acayucan (~ 30 ha), una franja ribereña estrecha pero larga de bosque secundario rodeado de pastizales. Esto es parte de una gran propiedad privada con acceso muy restringido a las personas y, por lo tanto, los monos a menudo no interactúan con asentamientos humanos o perros (Ho *et al.*, 2014).

4.3.2.4 Guatemala

El clima en Guatemala también es cálido subtropical. Durante el período de muestreo, mostró una temperatura media anual de 26.5° C, con un promedio máximo y mínimo de 33.6° y 20.2° C, respectivamente. La precipitación anual promedio ese año fue de 2,332.2 mm (INSIVUMEH, 2017). La zona donde se realizaron las capturas pertenece a la ecorregión “Bosques húmedos de Yucatán” (WWF, 2019).

Un grupo de *A. pigra* fue capturado en Guatemala en el sitio arqueológico 'El Chal', que es un fragmento de 21 ha de vegetación primaria y secundaria ubicado en el municipio de Dolores, al sur de Petén, con una elevación promedio de 270 msnm (Morales & Laporte 1995). La densidad de la población de monos aulladores aquí es de 90 individuos / km². El fragmento está rodeado de pastos de ganado y se encuentra cerca del pueblo "El Chal". Esta área constituye uno de los últimos fragmentos de bosque que perdura en la región y se ha mantenido allí debido al sitio arqueológico que está protegido por los guardias del parque. Aproximadamente solo 3.49 ha están cubiertas por una jungla madura de tamaño y composición adecuados para satisfacer las necesidades de los monos aulladores, donde están los templos mayas, y son constantemente visitados por turistas.

4.3.3 Toma de muestras

Durante las estaciones secas de 2008-2012, se recolectaron muestras de pelo de todos los individuos pertenecientes a 36 grupos, con un total de 200 monos aulladores: 49 monos aulladores negros en alopatría, 64 monos aulladores negros en simpatría, 75 monos aulladores de manto en simpatría, y 12 monos aulladores de manto en alopatría. Se siguieron los procedimientos de captura y manejo descritos en Canales-Espinosa *et al.* (2011). Para cada animal capturado, la recolección de pelo siguió un protocolo estándar: se cortó un mechón de pelo del área abdominal lo más cerca posible de la piel con unas tijeras quirúrgicas de punta fina, con cuidado de no dañar la piel. Cada muestra de pelo se colocó en un

sobre de papel, que a su vez se insertó en una bolsa de plástico y se almacenó en un ambiente fresco y oscuro hasta el momento del análisis.

Cuadro 4.1 *Fases de crecimiento capilar*

El pelo de estos primates no crece de manera indefinida, sino que tiene un crecimiento cíclico, llamado ciclo piloso. Cada ciclo piloso transita por tres fases; Fase Anágena: en esta fase el pelo está pegado a la papila, nace y crece. El pelo crece sin cesar debido a que las células de la matriz del folículo se dividen constantemente; Fase Catágena: es una fase de transición durante la cual el crecimiento se detiene y se separa de la papila, cesando la actividad de las células de la matriz, incluido los melanocitos; adicionalmente, el bulbo toma un aspecto cilíndrico; Fase Telógena: es la fase del descanso y de caída del pelo. La raíz del pelo toma un aspecto de cerilla y aún permanece insertado en el folículo algún tiempo hasta su caída (Camacho *et al.*, 2013).

Los folículos atraviesan veinte ciclos pilosos cada uno, independiente de los que haya a su alrededor, de manera que los pelos de un mismo mechón no pueden considerarse contemporáneos. De hecho, una muestra tomada de cualquier individuo sano contendrá un promedio de 85-90% de pelo en fase de crecimiento y un 10-15% en fase inactiva. Esta composición puede introducir un sesgo que puede confundir la información de la dieta más reciente que se puede obtener a partir de las fibras del pelo. Por esta razón, en esta fase del estudio, únicamente serán analizados los 5 cm más proximales a la base del pelo, y de esta manera la señal analizada se corresponderá prácticamente al alimento asimilado durante un período de aproximadamente 27 semanas (ca. 7 meses) previas a la toma de la muestra, considerando que la tasa de crecimiento del pelo para estas especies es de aproximadamente 1.8 mm semanales.

Estas poblaciones han sido el foco de un estudio para obtener datos morfológicos y de comportamiento en el cual se incluía la captura y contención de los individuos, durante la cual se recolectaron muestras de pelo. La combinación de datos de y morfológicos con muestras bien documentadas para el análisis proporcionó una prueba fortuita, pero adecuada de las expectativas descritas a continuación.

El material vegetal de los bosques particulares habitados por las poblaciones de monos no estaba disponible para el análisis. Aun así, dada la naturaleza general de las respuestas de las plantas a los procesos que ocurren durante la fotosíntesis, podemos suponer que los tejidos vegetales de la cubierta relativamente abierta de los bosques secos y caducifolios tienen proporciones de isótopos estables que son significativamente diferentes de las proporciones en los tejidos vegetales del dosel cerrado, en los bosques de hoja perenne.

4.3.4 *Análisis de isótopos estables*

Antes del análisis, se cortaron 10-15 pelos de cada mechón muestreado con la misma longitud (aproximadamente 5 cm, suficiente para evaluar la variación isotópica de varios meses; Anexo 1), lo más fino posible. Luego se homogeneizó manualmente el pelo y se colocó en tubos Eppendorf para limpiarlo secuencialmente con acetona, etanol y agua destilada en un rotador durante aproximadamente 1 h cada uno, para eliminar los lípidos o la suciedad adheridos. Todas las muestras se secaron en un horno (60 ° C) hasta alcanzar un peso constante. Esta metodología fue diseñada siguiendo los procedimientos de limpieza informados en diversos estudios que utilizaron muestras de pelo para el análisis isotópico (por ejemplo, Ayliffe *et al.*, 2004; Codron *et al.*, 2013b; Crowley, 2012; Schoeninger *et al.*, 1997).

Se pesaron submuestras de pelo (aproximadamente 0.4 mg para $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) y se colocaron en cápsulas de estaño. El análisis isotópico se realizó mediante análisis de espectrometría de masas elemental con relación isotópica utilizando un Thermo Finnigan Flash 1112 acoplado a un espectrómetro de masas con relación isotópica Delta a través de la

interfaz ConFlo III. Los análisis fueron realizados en el Centre de Serveis Científics i Tècnics (CCiT) de la Universidad de Barcelona. Las firmas de isótopos estables se informaron en notación δ convencional (‰). El estándar para $\delta^{13}\text{C}$ fue el carbonato de calcio Vienna PeeDee Belemnite (VPDB), y el estándar $\delta^{15}\text{N}$ fue el nitrógeno atmosférico (N_2). Se insertaron estándares internacionales (sulfato de amonio, nitrato de potasio, ácido glutámico para $\delta^{15}\text{N}$ y polietileno, sacarosa y ácido glutámico para $\delta^{13}\text{C}$) después de cada 12 muestras para calibrar el sistema y compensar en caso de desvío a través del tiempo. La precisión y exactitud fue ≤ 0.1 ‰ para $\delta^{13}\text{C}$ y ≤ 0.3 ‰ para $\delta^{15}\text{N}$.

4.3.5 Análisis de datos

El sexo no tuvo efectos significativos (modelos lineales mixtos usando la identificación del grupo como factor aleatorio) en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (*A. palliata*: $F_{288} = 0.03$, $P = 0.859$; *A. pigra*: $F_{3112} = 3.34$, $P = 0.071$) o $\delta^{15}\text{N}$ (*A. palliata*: $F_{288} = 1.97$, $P = 0.163$; *A. pigra*: $F_{3112} = 0.75$, $P = 0.390$). Por lo tanto, no se incluyó este factor en análisis posteriores. Las muestras de individuos infantiles ($N = 3$) no fueron analizadas en este estudio considerando la evidencia previa de que los infantiles (< 1 año de edad) normalmente presentan valores isotópicos atípicos debido a la fase de lactancia (Dalerum *et al.*, 2010; Reitsemá 2012).

Para caracterizar el nicho isotópico de cada especie en cada condición (es decir, alopatria versus simpatria), se calcularon: 1) valores isotópicos medios y se compararon los valores isotópicos con las pruebas de Kruskal-Wallis seguidas de pruebas post-hoc de Mann-Whitney con niveles de significancia corregido para comparaciones múltiples (Bonferroni corregido $P < 0.004$); 2) el rango de valores de $\delta^{13}\text{C}$, que es un proxy de la diversidad de recursos consumidos (Layman *et al.*, 2007); 3) el rango de valores de $\delta^{15}\text{N}$, que es una aproximación del número de niveles tróficos ocupados (Layman *et al.*, 2007); 4) la amplitud de nicho isotópico utilizando métricas bivariadas basadas en el espacio isotópico que conforman los valores de $\delta^{13}\text{C}$ x $\delta^{15}\text{N}$ (Jackson *et al.*, 2011). Específicamente, se calcularon las áreas de elipse de desviación estándar corregidas para un tamaño pequeño de muestra

(SEAc), que representan el tamaño del nicho isotópico de la población, corregido para tamaños de muestra pequeños. También se generaron estimaciones bayesianas de área de elipse de desviación estándar (SEAb) para verificar las diferencias en la amplitud de nicho isotópico a través de comparaciones de intervalos creíbles de 95% de SEAb; 5) solapamiento de SEAc de cada par de especie/condición como la proporción de la suma de las áreas no superpuestas de las elipses (función "bayesianOverlap" en SIBER).

Utilizando datos de grupos que habitan exclusivamente dentro de la localidad de simpatria (Tabasco), estimamos la diversidad isotópica de cada especie y el grado correspondiente de superposición isotópica entre las dos especies, a través de las métricas propuestas por Cucherousset & Villéger (2015). Este enfoque complementa el marco desarrollado por Layman *et al.* (2007) y Jackson *et al.* (2011) Si bien el primero es útil porque integra la importancia de los organismos en los bordes, su debilidad es que afecta el tamaño de la muestra. El área de elipse estándar no afecta el tamaño de la muestra, pero coloca el foco en el centro del nicho trófico.

Por otro lado, estas métricas de diversidad isotópica son matemáticamente independientes del número de organismos utilizados en el cálculo y pueden explicar la abundancia o biomasa de organismos. Además, este método ofrece una técnica para escalar ejes de isótopos estables, nivelados para tener el mismo rango (por ejemplo, 0-1), al cuantificar la diversidad isotópica y para cuantificar los niveles de superposición isotópica entre dos grupos de organismos, a fin de minimizar un potencial sesgo causado por la diferencia entre intervalos de valores y diferentes isótopos estables.

Todas las métricas y las áreas de elipse de desviación estándar se calcularon con el paquete R "SIBER" (Jackson & Parnell, 2019).

4.4 Resultados

Tanto los valores de $\delta^{13}\text{C}$ ($\chi^2_3 = 92.3$, $P < 0.001$), como los de $\delta^{15}\text{N}$ ($\chi^2_3 = 56.4$, $P < 0.001$) variaron entre especies / condiciones, siendo más altos ($P < 0.004$ en todas las comparaciones por pares) en monos aulladores negros que viven en alopatría y en monos aulladores negros en simpatría que en todas las demás especies/condiciones, respectivamente (Tabla 4.1; Figura 4.2). El rango de $\delta^{13}\text{C}$ fue muy similar entre especies/condiciones, aunque marginalmente más pequeño en los monos aulladores de manto que viven en alopatría. En alopatría, el rango de $\delta^{15}\text{N}$ fue el mismo en monos aulladores negros y monos aulladores de manto. El rango de $\delta^{15}\text{N}$ en monos aulladores negros en simpatría duplicó el de ambas especies en alopatría, mientras que los monos aulladores en simpatría tenían un rango intermedio.

El área de solapamiento fue la más alta entre los nichos isotópicos de ambas especies que vivían en simpatría, que era el doble del área de solapamiento entre los monos aulladores negros en alopatría y los monos aulladores de manto en simpatría (Figura 4.5). El SEAc de ambas especies en simpatría y de monos aulladores de manto en alopatría se solapó más que el SEAc de monos aulladores negros en alopatría y los monos aulladores negros en simpatría y los monos aulladores de manto en alopatría.

Las métricas de diversidad isotópica (Cucherousset & Villéger 2015), ayudan a visualizar mejor el grado de solapamiento de los nichos isotópicos de *A. pigra* y *A. palliata* únicamente en el área donde las dos especies concurren (Fig. 4.6). Estas medidas demostraron que, a pesar de compartir la misma área, e incluso el mismo parche en más de un caso, cada especie presenta diferente forma y tamaño de nicho isotópico. Se puede observar que en el área de simpatría la similitud isotópica entre ellas es muy baja (ca. 0.2), a pesar de ser un área relativamente pequeña, inclusive con algunos grupos compartiendo el mismo parche. De la misma manera, el anidamiento indicó que el grado de solapamiento isotópico entre las dos especies tampoco fue importante (ca. 0.5).

Los monos aulladores negros que vivían en alopatria y los monos aulladores de manto que vivían tanto en alopatria como en simpatria, tenían amplitudes de nicho isotópico similares, como lo demuestran los valores de SEAc y SEAb (Tabla 4.1; Figura 4.3). Los monos aulladores negros en simpatria tenían un nicho isotópico significativamente más amplio que otras especies/condiciones (Fig. 4.4).

Tabla 4.1. Valores isotópicos en pelo de dos especies de monos aulladores habitando en simpatria y alopatria en el sureste de México y Guatemala.

Variables de nicho isotópico	<i>Alouatta pigra</i>		<i>Alouatta palliata</i>	
	Alopatria <i>N</i> = 49	Simpatria <i>N</i> = 64	Simpatria <i>N</i> = 75	Alopatria <i>N</i> = 12
Media $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-24.5	-25.5	-25.5	-25.3
$\delta^{13}\text{C}$ rango (‰)	-25.9-(-23.8)	-26.4-(-24.2)	-26.4-(-24.7)	-25.9-(-24.7)
Media $\delta^{15}\text{N}$ (‰)	3.7	5.4	4.0	3.9
$\delta^{15}\text{N}$ rango (‰)	2.6-5.0	3.4-8.0	2.6-5.9	2.5-4.9
SEAc ^a	0.76	1.46	0.86	0.70
SEAb _{<i>b</i>} ^a	0.75	1.44	0.85	0.67
95% I.C. ^a	0.55-0.97	1.11-1.84	0.66-1.06	0.42-1.01

^a Áreas de elipse de desviación estándar corregidas para muestras pequeñas (SEAc), Áreas de elipse de desviación estándar Bayesianas (SEAb_{*b*}), y SEAb_{*b*}. Intervalos de credibilidad del 95% fueron calculados utilizando SIBER (ver Jackson *et al.*, 2011 para más detalles acerca de estas métricas).

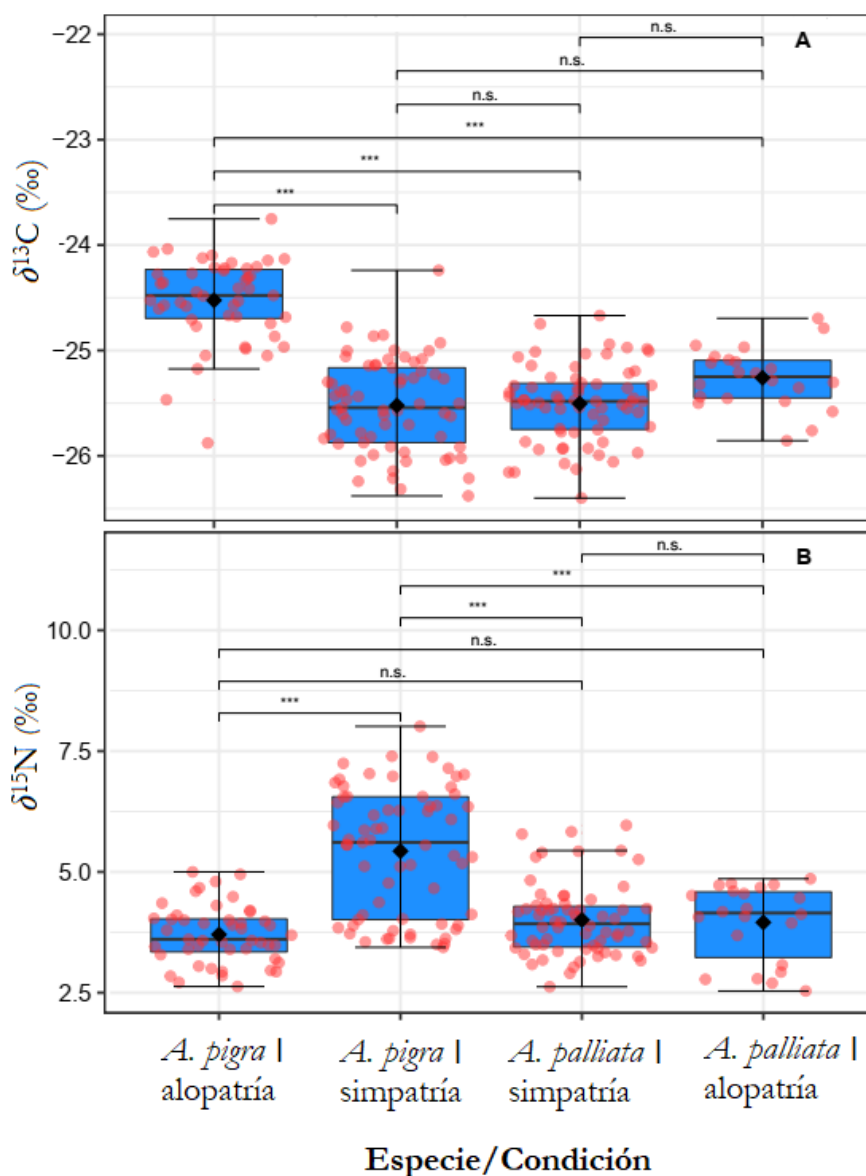


Figura 4.2 Variación en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (A) y $\delta^{15}\text{N}$ (B) entre las dos especies de monos aulladores que viven en alopatria y simpatria. Las líneas gruesas dentro de las cajas muestran las medianas; los diamantes negros son las medias; los límites de las casillas son los percentiles 25 y 75; los bigotes indican los valores mínimos y máximos; los puntos de datos se trazan como círculos rojos. Comparaciones por parejas realizadas con pruebas univariadas de Mann-Whitney: n.s. = no significativo; *** = $p < 0,004$.

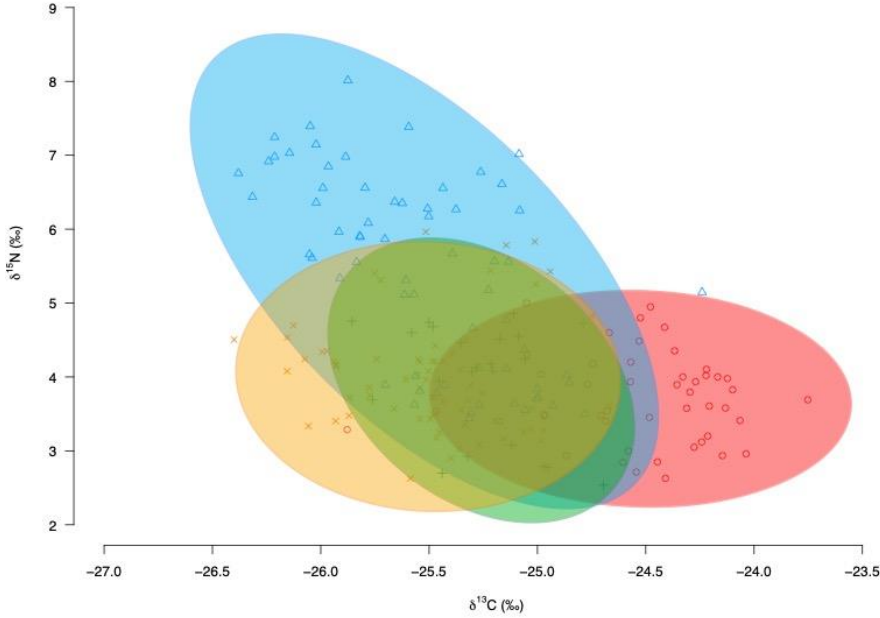


Figura 4.3 Variación en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de muestras de pelo de mono aullador y elipses bivariadas (SEAc) estimadas a través del análisis SIBER (Stable Isotope Bayesian Ellipses in R). *A. pigra* en alopatria = círculos rojos ovales y abiertos; *A. pigra* en simpatria = óvalo azul y triángulos abiertos; *A. palliata* en simpatria = óvalo naranja y signos de tiempos; *A. palliata* en alopatria = óvalo verde y signos más. SEAc se calcularon a partir de la varianza y la covarianza de las relaciones de isótopos y revela el núcleo central del nicho dietético isotópico de los animales de estudio.

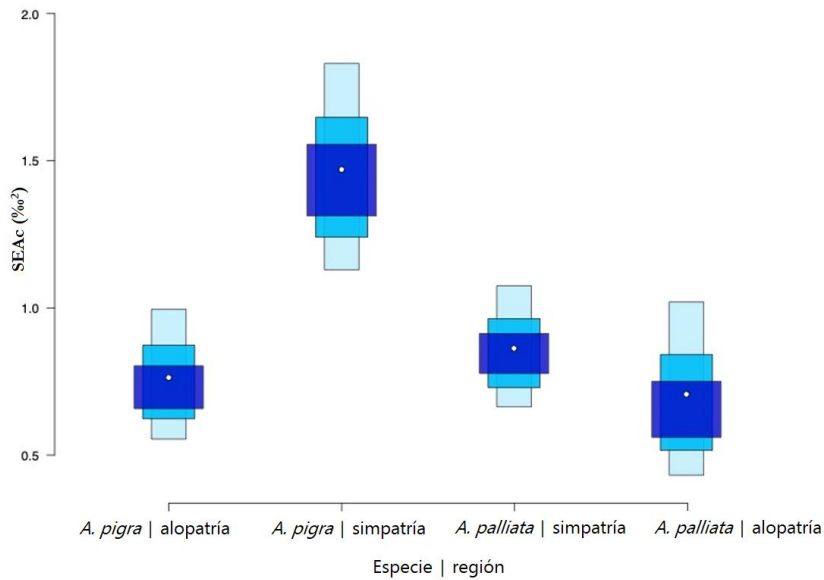


Figura 4.4 Gráficos de densidad que muestran los intervalos de credibilidad de las áreas de elipse de desviación estándar para monos aulladores alopatricos y simpátricos estimados por análisis SIBER. Azul pálido=50%, azul claro= 75% y azul oscuro= 95%. Los puntos blancos son las áreas de elipse de desviación estándar promedio de cada especie/condición corregida para un tamaño de muestra pequeño (SEAc).

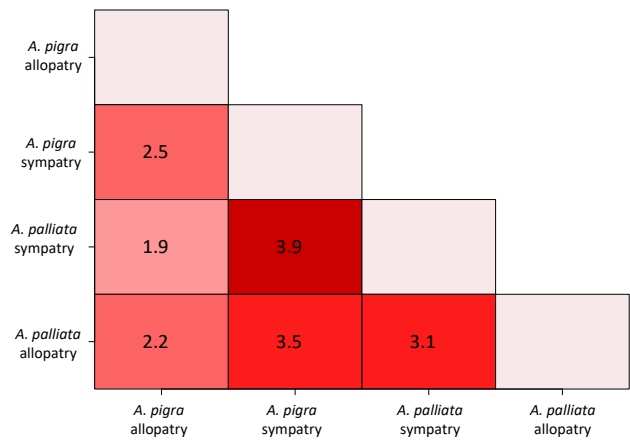


Figura 4.5 Solapamiento (números dentro de los recuadros) de las áreas de elipse de desviación estándar (SEAc) de monos aulladores alopatricos y simpátricos estimados por análisis SIBER. La intensidad del color aumenta con el solapamiento de SEAc.

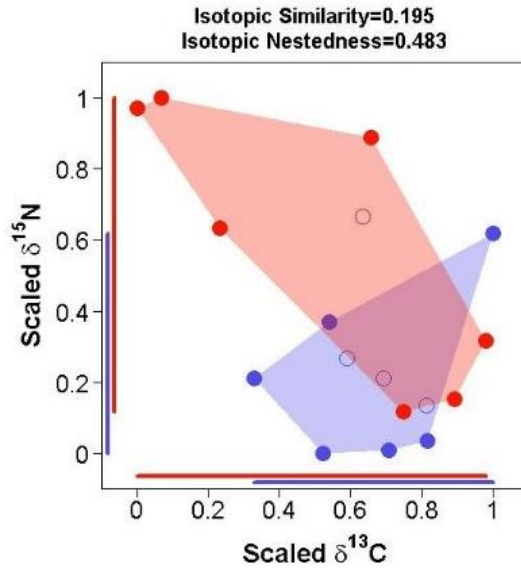


Figura 4.6 Similitud y Anidación de nichos isotópicos. *A. pigra* (rojo) y *A. palliata* (azul) en la zona de simpatría.

4.5 Discusión

Aprovechando un área de simpatría natural entre dos especies de monos aulladores se analizó si la coexistencia de especies ecológicamente similares está asociada a la partición del nicho trófico, evaluada a través del cálculo de nicho isotópico. Conforme a la hipótesis planteada, en condiciones alopátricas la amplitud del nicho isotópico y la variación isotópica fueron similares en los monos aulladores de manto y negros, lo que confirma su similitud ecológica a nivel trófico. También se encontró evidencia de partición de nicho trófico entre estas dos especies en simpatría. Sin embargo, contrariamente a las predicciones, esta partición no estaba vinculada a la segregación de nicho isotópico, como lo indica la alta proporción de nichos isotópicos no solapados. Más bien, los monos aulladores negros tenían un nicho isotópico significativamente más amplio en simpatría, que estaba determinado principalmente por los altos valores de $\delta^{15}\text{N}$, e incluía la mayor parte del nicho isotópico de los monos aulladores de manto. Además, el nicho isotópico de los monos

aulladores de manto no fue diferente entre simpatría y alopatría. Por lo tanto, es posible que la coexistencia de estas dos especies esté vinculada a ajustes tróficos realizados por los monos aulladores negros.

Los valores isotópicos que encontramos son consistentes con los previamente reportados para monos aulladores de América Central y del Sur (Schoeninger *et al.*, 1997; van der Merwe & Medina, 1991), así como con valores reportados para otros primates (por ejemplo, grandes simios: Oelze *et al.*, 2014; lémures: Crowley *et al.*, 2013). Es probable que esta consistencia se deba al hecho de que los monos aulladores, como la mayoría de los primates (Harcourt, 2006), habitan en bosques tropicales dominados por vegetación con una ruta fotosintética C_3 (Blumenthal *et al.*, 2016). Aun así, los monos aulladores negros presentaron un rango isotópico mayor que el reportado en estudios previos para este género, especialmente en valores de $\delta^{15}N$. Además de su posible relación con un alto grado de flexibilidad trófica de esta especie cuando se encuentra en simpatría (discutido más adelante), es importante tener en cuenta que nuestros resultados se basan en un tamaño de muestra ($N = 200$ individuos) considerablemente mayor que el de los anteriores estudios ($N = 12$ en Schoeninger *et al.*, 1997; $N = 1$ en van der Merwe & Medina, 1991).

Los monos aulladores negros que vivían en simpatría con los monos aulladores de manto tenían el nicho isotópico más amplio, mientras que la amplitud del nicho no variaba entre las especies/condiciones restantes. No obstante, hubo un gran solapamiento de nicho entre las especies en simpatría. La superposición de nichos entre especies básicamente define la exclusión o coexistencia de especies cuando tiene lugar la competencia (De Roos *et al.*, 2008). El solapamiento de nichos puede causar ajustes en el uso del hábitat y el nicho trófico (por ejemplo, Lush *et al.*, 2017; Merkle *et al.*, 2017; Oelze *et al.*, 2014), pero también marginación y desaparición de especies (por ejemplo, Beaudrot *et al.*, 2013; Simon & Townsend, 2003; Steinmetz *et al.*, 2011). Por el contrario, la diversificación de nichos, en la que las especies competidoras se centran en diferentes recursos o explotan los mismos recursos en diversos lugares o momentos (es decir, la división del nicho espacial o temporal), favorece la coexistencia de especies

(Chesson 2000; Tilman 1982). Dado que, a pesar de la importante variación en el clima y la vegetación, el nicho isotópico de los monos aulladores de manto no varió significativamente entre las condiciones, la coexistencia de los monos aulladores de manto y negro probablemente se ve favorecida por la diversificación del nicho isotópico por parte de los monos aulladores negros. Las observaciones a largo plazo sobre los patrones de distribución de especies en simpatria confirmarían si se produce la coexistencia o la exclusión, aunque la alteración del hábitat que se presenta actualmente en el área amenaza gravemente la viabilidad de ambas poblaciones (Dias *et al.*, 2013).

En ausencia de observaciones de comportamiento y de medición de isótopos estables en los alimentos consumidos por los monos aulladores, solamente es posible especular sobre las causas de la variación observada en los valores isotópicos. Mientras que es plausible sugerir que el alto $\delta^{13}\text{C}$ de los monos aulladores negros en alopatria, la condición más seca en del estudio, podría estar asociado a una relación negativa entre los niveles de lluvia y $\delta^{13}\text{C}$, correlación que se ha reportado frecuentemente (por ejemplo, Schoeninger *et al.*, 2016), es más difícil explicar el alto $\delta^{15}\text{N}$ de esta especie en simpatria. Los valores medios de $\delta^{15}\text{N}$ de los monos aulladores negros en simpatria fueron similares a los de chimpancés omnívoros (*Pan troglodytes*: Oelze *et al.*, 2014), lémures de ratón insectívoros-frugívoros (*Microcebus* spp.: Crowley *et al.*, 2013), o monos araña frugívoros (*Ateles geoffroyi*: Schoeninger *et al.*, 1997). Por lo tanto, es posible que los monos aulladores negros consuman más alimentos enriquecidos en nitrógeno que los monos aulladores de manto, como leguminosas (Schoeninger *et al.*, 1997) o alimentos de origen animal (Crowley *et al.*, 2013; Fahy *et al.*, 2013; Oelze *et al.*, 2011). Aun así, las diferencias de las medias en $\delta^{15}\text{N}$ entre los monos aulladores negros simpátricos y otras especies/condiciones no alcanzaron el umbral de 3‰, que generalmente se considera como reflejo de un cambio en el nivel trófico (Ben-David & Flaherty 2012; Blumenthal *et al.*, 2016 ; Crowley, 2012; DeNiro & Epstein, 1981; Post, 2002), sugiriendo que el consumo de proteína animal, si se produce, puede ser poco frecuente o restringido a contextos particulares (p. ej., individuos con acceso a huevos: Bicca-Marques *et al.*, 2009).

Si la variación del nicho isotópico entre las especies de monos aulladores que viven en simpatría está realmente vinculada a la variación del nicho trófico, sus mecanismos subyacentes quedan por determinar. Es sabido que, en comparación con los monos aulladores de manto, los monos aulladores negros en promedio dedican más tiempo al consumo de frutas que a las hojas (Días & Rangel-Negrín, 2015) y que puede haber variación entre las especies en la visión del color (Matsushita *et al.*, 2014). La variación a pequeña escala en las proporciones de los alimentos consumidos y la variación sensorial podrían facilitar la coexistencia de las especies (Falk *et al.*, 2015; Lush *et al.*, 2017), incluso en ausencia de una partición espacial o temporal en el nicho (Carothers & Jaksic, 1984; Schoener 1974), por lo que la futura investigación sobre los mecanismos de partición de nicho podría centrarse en estos factores.

En resumen, se halló evidencia de que el nicho isotópico de dos especies de monos aulladores varía de alopatría a simpatría a través de la ampliación del nicho isotópico de una de las especies cuando se encuentra en simpatría. Por lo tanto, los resultados sugieren que la coexistencia de los monos aulladores negros y de manto está vinculada a ajustes de nicho trófico, aunque las características particulares de dichos ajustes (por ejemplo, partición dietética, espacial o sensorial) aún quedan pendientes de abordar en futuras investigaciones.

4.6 Referencias

- Ambrose SH (1990). Preparation and characterization of bone and tooth collagen for isotopic analysis. *Journal of Archaeological Science*, 17, p 431–451.
- Araújo MS, Bolnick DI & Layman CA (2011). The ecological causes of individual specialisation. *Ecology Letters*, 14, 948–958.
- Ayliffe L, Cerling T, Robinson T, West A, Sponheimer M, Passey BH, Hammer J, Roeder B, Dearing MD & Ehleringer JR (2004). Turnover of carbon isotopes in tail hair and breath CO₂ of horses fed an isotopically varied diet. *Oecologia*, 139, 11–22.
- Bearhop S, Adams CE, Waldron S, Fuller RA & Macleod H (2004). Determining trophic niche width: A novel approach using stable isotope analysis. *Journal of Animal Ecology*, 73, 1007–1012.
- Beaudrot L, Struebig MJ, Meijaard E, Van Balen S, Husson S & Marshall AJ (2013). Cooccurrence patterns of Bornean vertebrates suggest competitive exclusion is strongest among distantly related species. *Oecologia*, 173, 1053–1062.
- Beck HE, Zimmermann NE, McVicar TR, Vergoplan N, Berg A & Wood EF (2018). Present and future Köppen-Geiger climate classification maps at 1-km resolution. *Scientific Data*, 5, 180214.
- Ben-David M & Flaherty EA (2012). Stable isotopes in mammalian research: A beginner's guide. *Journal of Mammalogy*, 93, 312–328.
- Bicca-Marques JC, Muhle CB, Prates HM, de Oliveira SG & Calegario-Marques C (2009). Habitat impoverishment and egg predation by *Alouatta caraya*. *International Journal of Primatology*, 30, 743–748.
- Blumenthal SA, Rothman JM, Chritz KL & Cerling TE (2016). Stable isotopic variation in tropical forest plants for applications in primatology. *American Journal of Primatology*, 78, 1041–1054.
- Camacho FM, Tosti A, Randall VA & Price VH (2013) Tricología. enfermedades del folículo pilosebáceo. Libros Princeps. Biblioteca Aula Médica. Vol 1. Tercera edición. Madrid.
- Canales-Espinosa D, Dias PAD, Rangel-Negrín A, Aguilar-Cucurachi S, García-Orduña F & Hermida-Lagunes J (2011). Translocación de

- primates mexicanos. En: PAD Dias, A Rangel-Negrín, D. Canales-Espinosa (Eds.), *La conservación de los primates en México* (p 81–107). Xalapa, Ver: Consejo Veracruzano de Ciencia y Tecnología.
- Carothers JH & Jaksic FM (1984). Time as a niche difference: The role of interference competition. *Oikos*, 42, p 403–406.
- Chase JM & Leibold MA (2003). *Ecological niches*. Chicago, IL: University of Chicago Press.
- Chesson P (2000). Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31, p 343–366.
- Codron J, Kirkman K, Duffy KJ, Sponheimer M, Lee-Thorp JA, Ganswindt A, Clauss M & Codron D (2013b). Stable isotope turnover and variability in tail hairs of captive and free-ranging African elephants (*Loxodonta africana*) reveal dietary niche differences within populations. *Canadian Journal of Zoology*, 91, 124–134.
- _____, Lee-Thorp JA, Sponheimer M & Codron D (2013a). Plant stable isotope composition across habitat gradients in a semi-arid savanna: implications for environmental reconstruction. *Journal of Quaternary Science*, 28, 301–310.
- Cortés-Ortiz L, Duda TF, Canales-Espinosa D, García-Orduña F, Rodríguez-Luna E & Bermingham E (2007). Hybridization of large-bodied New World primates. *Genetics*, 176, 2421–2425.
- _____, Agostini I, Aguiar LM, Kelaita M, Silva FE & Bicca-Marques JC (2015b). Hybridization in howler monkeys: current understanding and future directions. En: M. Kowalewski, P. Garber, L. Cortés-Ortiz, B. Urbani, & D. Youlatos (Eds.), *Howler monkeys: Adaptive radiation, systematics, and morphology* (pp. 107–131). New York: Springer.
- _____, Rylands AB & Mittermeier RA (2015a). The taxonomy of howler monkeys: Integrating old and new knowledge from morphological and genetic studies. En: M. Kowalewski, P. Garber, L. Cortés-Ortiz, B. Urbani, & D. Youlatos (Eds.), *Howler monkeys: Adaptive radiation, systematics, and morphology* (pp. 55–84). New York: Springer.

- _____, Nidiffer MD, Hermida-Lagunes J, García-Orduña F, Rangel-Negrín A, Kitchen DM, Bergman TB, Dias PAD & Canales-Espinosa D (2019). Reduced introgression of sex chromosome markers in the Mexican howler monkey (*Alouatta palliata* x *A. pigra*) hybrid zone. *International Journal of Primatology*, 40, 114–131.
- Craine JM, Elmore AJ, Aida MPM, Bustamante M, Dawson TD, Hobbie EA, Kahmen A, Mack MC, McLauchlan KK, Michelsen A, Nardoto GB, Pardo LH, Peñuelas J, Reich PB, Schuur EAG, Stock WD, Templer PH, Virginia RA, Welker JM & Wright IJ (2009). Global patterns of foliar nitrogen isotopes and their relationships with climate, mycorrhizal fungi, foliar nutrient concentrations, and nitrogen availability. *New Phytologist*, 183, 980–992.
- Crawford K, McDonald RA & Bearhop S (2008). Applications of stable isotope techniques to the ecology of mammals. *Mammal Review*, 38, 87–107.
- Crowley BE (2012). Stable isotope techniques and applications for primatologists. *International Journal of Primatology*, 33, 673–701.
- _____, Blanco MB, Arrigo-Nelson SJ & Irwin MT (2013). Stable isotopes document resource partitioning and effects of forest disturbance on sympatric cheirogaleid lemurs. *Naturwissenschaften*, 100, 943–956.
- Dalerum F, Bennett NC & Clutton-Brock TH (2007). Longitudinal differences in ¹⁵N between mothers and offspring during and after weaning in a small cooperative mammal, the meerkat (*Suricata suricatta*). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, 1889–1892.
- Dammhahn M & Kappeler PM (2014). Stable isotope analyses reveal dense trophic species packing and clear niche differentiation in a Malagasy primate community. *American Journal of Physical Anthropology*, 153, 249–259.
- Davies TJ, Meiri S, Barraclough TG & Gittleman JL (2007). Species co-existence and character divergence across carnivores. *Ecology Letters*, 10, 146–152.
- Dayan T & Simberloff D (2005). Ecological and community-wide character displacement: The next generation. *Ecology Letters*, 8, 875–894.

- Deane AS, Nargolwalla MC, Kordos L & Begun DR (2013). New evidence for diet and niche partitioning in *Rudapithecus* and *Anapithecus* from Rudabánya, Hungary. *Journal of Human Evolution*, 65, 704–714.
- DeNiro MJ & Epstein S (1981). Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45, 341–351.
- De Roos AM, Schellekens T, Van Kooten T & Persson L (2008). Stage-specific predator species help each other to persist while competing for a single prey. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 13930–13935.
- Dias PAD & Rangel-Negrín A (2015). Diets of howler monkeys. En: M. Kowalewski, P. Garber, L. Cortés-Ortiz, B. Urbani, & D. Youlatos (Eds.), *Howler monkeys: Behavior, ecology and conservation* (pp. 21–56). New York: Springer.
- _____, Alvarado D, Rangel-Negrín A, Canales-Espinosa D & Cortés-Ortiz L (2013). Landscape attributes affecting the natural hybridization of Mexican howler monkeys. En: L. Marsh, & C. A. Chapman (Eds.), *Primates in Fragments* vol. 2 (pp. 423–435). New York: Springer.
- Diefendorf AF, Mueller KE, Wing SL, Koch PL & Freeman KH (2010). Global patterns in leaf ^{13}C discrimination and implications for studies of past and future climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 107, 5738–5742.
- Ehleringer JR & Cooper TA (1988). Correlations between carbon isotope ratio and microhabitat in desert plants. *Oecologia*, 76, 562–566.
- Fahy GE, Richards MP, Riedel J, Hublin JJ & Boesch C (2013). Stable isotope evidence of meat eating and hunting specialization in adult male chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 5829–5833.
- Falk JJ, ter Hofstede HM, Jones PL, Dixon MM, Faure PA, Kalko EK & Page RA (2015). Sensory-based niche partitioning in a multiple predator–multiple prey community. *Proceedings of the Royal Society B*, 282, 20150520.

- Farquhar G, Ehleringer JR & Hubick HT (1989). Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual review of plant physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 503–537.
- Ganzhorn JU, Wright PC & Ratsimbazafy J (1999). Primate communities: Madagascar. En: J. G. Fleagle, C. H. Janson, & K. E. Reed (Eds.), *Primate communities* (pp. 75–89). Cambridge: Cambridge University Press.
- Grant PR & Grant BR (2002). Unpredictable evolution in a 30-year study of Darwin's finches. *Science*, 296, 707–711.
- Harcourt AH (2006). Rarity in the tropics: Biogeography and macroecology of the primates. *Journal of Biogeography*, 33, 2077–2087.
- Heaton THE (1987). The $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios of plants in South Africa and Namibia: Relationship to climate and coastal/saline environments. *Oecologia*, 74, 236–246.
- Ho L, Cortés-Ortiz L, Dias PAD, Canales-Espinosa D, Kitchen DM & Bergman TJ (2014). Effect of ancestry on behavioral variation in two species of howler monkeys (*Alouatta pigra* and *A. palliata*) and their hybrids. *American Journal of Primatology*, 76, 855–867.
- Hobson KA (1999). Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: A review. *Oecologia*, 120, 314–326.
- _____ & Clark RG (1992). Assessing avian diets using stable isotopes II: Factors influencing diet-tissue fractionation. *Condor*, 94, 189–197.
- Hutchinson GE (1957). Concluding remarks. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 22, 415–427.
- Jackson A, Inger R, Parnell AC & Bearhop S (2011). Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER – Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *Journal of Animal Ecology*, 80, 595–602.
- _____ & Parnell AC (2019). Package SIBER. R package version 2.1.4.
- Kelaita M, Dias PAD, Aguilar-Cucurachi MS, Canales-Espinosa D & Cortés-Ortiz L (2011). Impact of intrasexual selection on sexual dimorphism and testes size in the Mexican howler monkeys *Alouatta palliata* and *A. pigra*. *American Journal of Physical Anthropology*, 146, 179–187.

- Kitchen DM, Cortés-Ortiz L, Ho L, Dias PAD, Canales-Espinosa D & Bergman TJ (2017). Temporal but not acoustic plasticity in hybrid howler monkey (*Alouatta palliata* x *A. pigra*) loud calls. *International Journal of Primatology*, 40, 132–152
- Kohn MJ (2010). Carbon isotope compositions of terrestrial C₃ plants as indicators of (paleo) ecology and (paleo) climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107, 19691–19695.
- Kowalewski M, Garber P, Cortés-Ortiz L, Urbani B & Youlatos D (2015a). Howler monkeys: Adaptive radiation, systematics, and morphology. New York: Springer.
- _____, Garber P, Cortés-Ortiz L, Urbani B & Youlatos D (2015b). Howler monkeys: Behavior, ecology and conservation. New York: Springer.
- Kuhn VV, Romero GQ, Linhares AX, Vizentin-Bugoni J, Porto EAC & Setz EZF (2017). Diet overlap and spatial segregation between two neotropical marsupials revealed by multiple analytical approaches. *PLoS ONE*, 12, e0181188.
- Layman CA, Arrington DA, Montaña CG & Post DM (2007). Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? *Ecology*, 88, 42–48.
- López-Bao JV, Mattisson J, Persson J, Aronsson M & Andrén H (2016). Tracking neighbours promotes the coexistence of large carnivores. *Scientific Reports*, 6, 23198.
- Lush L, Ward AI & Wheeler P (2017). Dietary niche partitioning between sympatric brown hares and rabbits. *Journal of Zoology*, 303, 36–45.
- Martinelli LA, Piccolo MC, Townsend AR, Vitousek PM, Cuevas E, McDowell W, Robertson GP, Santos OC & Treseder K (1999). Nitrogen stable isotopic composition of leaves and soil: Tropical versus temperate forests. *Biogeochemistry*, 46, 45–65.
- Matsushita Y, Oota H, Welker BJ, Pavelka MS & Kawamura S (2013). Color vision variation as evidenced by hybrid L/M opsin genes in wild populations of trichromatic *Alouatta* New World monkeys. *International Journal of Primatology*, 35, 71–87.

- Merkle JA, Polfus JL, Derbridge JJ & Heinemeyer KS (2017). Dietary niche partitioning among black bears, grizzly bears and wolves in a multi-prey ecosystem. *Canadian Journal of Zoology*, 95, 663–671.
- Newsome SD, Martínez del Río C, Bearhop S & Phillips DL (2007). A niche for isotopic ecology. *Frontiers in Ecology and Environment*, 5, 429–436.
- Oelze VM (2016). Reconstructing temporal variation in great ape and other primate diets: A methodological framework for isotope analyses in hair. *American Journal of Primatology*, 78, 1004–1016.
- _____, Fuller BT, Richards MP, Fruth B, Surbeck M, Hublina J-J & Hohmann G (2011). Exploring the contribution and significance of animal protein in the diet of bonobos by stable isotope ratio analysis of hair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 9792–9797.
- _____, Head JS, Robbins MM, Richards M & Boesch C (2014). Niche differentiation and dietary seasonality among sympatric gorillas and chimpanzees in Loango National Park (Gabon) revealed by stable isotope analysis. *Journal of Human Evolution*, 66, 95–106.
- Peres CA & Janson CH (1999). Species coexistence, distribution and environmental determinants of neotropical primate richness: A community-level zoogeographic analysis. En: J. G. Fleagle, C. H. Janson, & K. E. Reed (Eds.), *Primate communities* (pp. 55–74). Cambridge: Cambridge University Press.
- Pianka ER (1981). Competition and niche theory. En: R. M. May (Ed.), *Theoretical ecology* (pp. 167–196). Oxford: Blackwell.
- Post DM (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position: Models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83, 703–718.
- Reitsema L (2012). Introducing fecal stable isotope analysis in primate weaning studies. *American Journal of Primatology*, 74, 926–939.
- Sánchez Colón S, Flores Martínez A, Cruz-Leyva IA & Velázquez A (2009). Estado y transformación de los ecosistemas terrestres por causas humanas. En: CONABIO (Ed.), *Capital natural de México*, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio (pp. 75–129). México: CONABIO.

- Schoener TW (1974). Resource partitioning in ecological communities. *Science*, 185, 27–39.
- Schoeninger MJ, Iwaniec UT & Glander KE (1997). Stable isotope ratios indicate diet and habitat use in New World Monkeys. *American Journal of Physical Anthropology*, 103, 69–83.
- , Most CA, Moore JJ & Somerville AD (2016). Environmental variables across *Pan troglodytes* study sites correspond with the carbon, but not the nitrogen, stable isotope ratios of chimpanzee hair. *American Journal of Primatology*, 78, 1055–1069.
- Simon KS & Townsend CR (2003). Impacts of freshwater invaders at different levels of ecological organisation, with emphasis on salmonids and ecosystem consequences. *Freshwater Biology*, 48, 982–994.
- Steinmetz R, Garshelis DL, Chutipong W & Seuaturien N (2011). The shared preference niche of sympatric Asiatic black bears and sun bears in a tropical forest mosaic. *PLoS ONE*, 6, e14509.
- Swap RJ, Aranibar JN, Bowty PR, Gilhooly WP III & Macko SA (2004). Natural abundance of ^{13}C and ^{15}N in C_3 and C_4 vegetation of southern Africa: Patterns and implications. *Global Change Biology*, 10, 350–358.
- Szpak P, White CD, Longstaffe FJ, Millaire J-F & Vásquez Sánchez VF (2013). Carbon and nitrogen isotopic survey of northern Peruvian plants: Baselines for paleodietary and paleoecological studies. *PLoS ONE*, 8, e53763.
- Tilman D (1982). Resource competition and community structure. New Jersey: Princeton University Press.
- Turner TF, Collyer ML & Krabbenhoft TJ (2010). A general hypothesis-testing framework for stable isotope ratios in ecological studies. *Ecology*, 91, 2227–2233.
- Vanak AT, Fortin D, Thaker M, Ogden M, Owen C, Greatwood S & Slotow R (2013). Moving to stay in place: behavioral mechanisms for coexistence of African large carnivores. *Ecology*, 94, 2619–2631.
- van der Merwe NJ & Medina E (1991). The canopy effect, carbon isotope ratios and foodwebs in Amazonia. *Journal of Archaeological Science*, 18, 249–259.

- Vernes K (2003). Fine-scale habitat preferences and habitat partitioning by three mycophagous mammals in tropical wet sclerophyll forest, north-eastern Australia. *Austral Ecology*, 28, 471–479.
- Wisheu IR (1998). How organisms partition habitats: Different types of community organization can produce identical patterns. *Oikos*, 83, 246–258.
- World Wildlife Fund (2019). Terrestrial ecoregions. Consultado en: www.worldwildlife.org/biome-categories/terrestrial-ecoregions

Capítulo 5

Discusión y sugerencias para futuros
estudios

La presente Tesis se dividió en tres apartados orientados a entender de qué manera los primates mexicanos responden a la variabilidad en la disponibilidad de alimento en un entorno altamente afectado por la perturbación antropogénica, a través de dos métodos no invasivos frecuentemente utilizados en los últimos años en ecología animal: la evaluación de metabolitos de hormonas esteroides presentes en heces y el análisis de isótopos estables en pelo.

Ambos enfoques aportaron valiosa información al estudio fisiológico, socio ecológico y trófico de estas especies que de otra manera sería imposible conocer. Por un lado, la evaluación hormonal en heces permitió establecer valores de referencia para una especie ampliamente estudiada (*Alouatta pigra*), con los que hasta ahora no se contaba. Asimismo, las herramientas endócrinas permitieron correlacionar la respuesta fisiológica frente a cambios en la disponibilidad de alimento en un grupo experimental de *Ateles geoffroyi*, a pesar de no observarse cambios significativos en las interacciones sociales, derivados de dichos cambios en la presentación de la dieta.

Por otra parte, se llevó a cabo un estudio integrando el análisis de isótopos estables en pelo para describir la amplitud y solapamiento de los nichos isotópicos de dos especies de mono aullador (*Alouatta pigra* y *A. palliata*), en condiciones tanto de simpatria, como de alopatría. La descripción del nicho isotópico de ambas especies a través de esta técnica resultó adecuada para explorar aspectos de su ecología trófica desde una nueva perspectiva, revelando evidencia de un posible ajuste trófico cuando se encuentran en condiciones de simpatria, un proceso difícil de advertir únicamente a través de métodos clásicos de observación de la conducta.

A pesar de que estas técnicas poseen un vasto potencial para el conocimiento ecológico y fisiológico de primates, es importante resaltar que ambas ofrecen un enfoque **complementario** a la observación directa de estas especies. Es decir, los resultados que arrojan tienen un alcance limitado per se y deben estar siempre englobados en el contexto ecológico de cada especie.

Este estudio destaca la importancia de adoptar un enfoque multifactorial para comprender cómo la dieta, el estrés y la coexistencia pueden tener efectos interactivos que influyen en la dinámica de las poblaciones de estos primates.

5.1 Validación fisiológica y analítica de los métodos de extracción y determinación hormonal

En primer lugar, se realizó la validación analítica de dos métodos de determinación hormonal: Radioinmunoensayo (RIA) y Quimioluminiscencia (SPECI) en cuatro hormonas esteroides: cortisol, estradiol, progesterona y testosterona. Dichas hormonas fueron extraídas de heces de monos aulladores negros (*Alouatta pigra*) en libertad. También se llevó a cabo la validación fisiológica de dichas hormonas, es decir, se demostró que las funciones fisiológicas de dichas hormonas pueden ser determinadas por métodos no farmacológicos.

Asimismo, con el objetivo de determinar cuál método de extracción es más eficaz para obtener estas mismas hormonas, se llevó a cabo la comparación de dicho método en base seca utilizando dos disolventes: metanol (100%) y etanol (100%). Los resultados de los dos métodos de extracción empleados mostraron porcentajes de recuperación similares en las cuatro hormonas analizadas, promediando 55.3% ($\approx 50-59.65\%$, dependiendo de la hormona). Esto coincide con lo hallado por Wasser y Hunt (2005), quienes llevaron a cabo la comparación entre etanol y metanol en concentraciones del 90% y 100% con el método de ebullición con el propósito de medir la recuperación de glucocorticoides, en donde ambos métodos arrojan valores similares. Cabe mencionar que, para el caso de cortisol, los resultados fueron consistentes con estudios que han demostrado que el metanol al 80% es el diluyente que logra una mejor extracción de cortisol en muestras secas, por encima del etanol (Aguilar, 2010).

A pesar de que los primates del Nuevo Mundo tienen una concentración más alta de esteroides excretados tanto en orina como en heces que primates del Viejo Mundo (Ziegler *et al.*, 1997), la eficiencia de

recuperación hormonal hallada en la presente investigación es baja a comparación con la reportada en estudios realizados con otros mamíferos, incluyendo primates del Viejo Mundo. En estos, se han registrado valores entre 70-95%, obteniendo incluso hasta un 100% dependiendo del esteroide y la especie estudiada (Wasser *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2004; Wasser & Hunt 2005; Van Belle *et al.*, 2009; entre otros).

Lo anterior puede deberse a diferentes factores, entre los cuales se puede mencionar que en dichos estudios se utilizó el método de ebullición, mientras que aquí se usó el baño maría. Otra razón puede ser la diferencia en el tiempo que se agitaron las muestras en el vórtex, ya que en este estudio este procedimiento solamente se aplicó por 1 min, mientras que otros autores (Ziegler y Wittwer, 2005) recomiendan un tiempo de 5 min. Destaca el hecho de que, a diferencia del presente trabajo, otros autores trabajaron con muestras húmedas y obtuvieron porcentajes de recuperación mayores (Cristóbal-Azkarate *et al.*, 2007, Martínez-Mota *et al.*, 2007 y 2008; Van Belle *et al.*, 2009), si bien esto discrepa de Wasser y col. (1993), quienes opinan que al secar las muestras se reduce la variación en la cantidad de flujo, lo que deriva en valores finales más consistentes de concentraciones esteroides. Cabe además destacar que el porcentaje de humedad en muestras fecales de monos aulladores puede alcanzar el 80%, pero que esta varía de acuerdo con el tipo de ítems alimenticios que los individuos consumen previo al momento de la colecta de las muestras (Ramírez-Saldivar, 2007). Por lo tanto, ya que la concentración de humedad puede interferir en la medición de las concentraciones de hormonas, es preferible realizar la medición de hormonas en muestras secas.

En los últimos años se han utilizado los dos diluyentes en diversos estudios (Rangel-Negrín *et al.*, 2009; Lynch *et al.*, 2003; Hunt *et al.*, 2004; Hernández, 2006), así como mezclas de ambos (Van Belle *et al.*, 2009; Wasser *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2004; Ziegler *et al.*, 2000). Al respecto, Ziegler y Wittwer (2005) recomiendan usar por lo menos 30% de solvente, ya sea etanol o metanol, aconsejando incluso utilizar una mezcla de ambos. La ventaja de esto reside en que tanto esteroides conjugados, como sin conjugar, serán extraídos de la muestra fecal. En

este sentido, se recomienda utilizar aquel del cual se tenga mayor disponibilidad en el sitio de análisis, ya que, como mostraron los resultados, las diferencias en costos y desempeño no son significativas para extracciones de hormonas en estos primates.

Por su parte, los resultados arrojados por los dos métodos de determinación comparados a lo largo de las diferentes pruebas de validación efectuadas (exactitud, precisión, sensibilidad, especificidad, intervalo de calibración y volumen requerido), revelaron que el mismo ensayo puede no ser el más apto en todos los sentidos para un mismo esteroide. En virtud de que las hormonas esteroides son fuertemente metabolizadas previo a la excreción, no es de sorprender que los ensayos que utilizan anticuerpos específicos para detectar esteroides en suero o plasma puedan no ser apropiados para la cuantificación de metabolitos esteroides solamente presentes en heces (Whitten *et al.*, 1998; Young *et al.* 2004). Sin embargo, a pesar de que los anticuerpos utilizados en la presente investigación (Immulite® y COAT-A-COUNT®), fueron originalmente desarrollados para cuantificar niveles de esteroides en suero o plasma de animales de laboratorio, (ej., conejos), han demostrado reaccionar apropiadamente con metabolitos esteroides en muestras fecales en numerosas especies de primates (Cristóbal-Azkarate *et al.*, 2006; Foerster & Monfort 2010; Rangel-Negrín *et al.*, 2014b; Bertoli *et al.*, 2019; Behringer V & Deschner 2017; Dias *et al.*, 2017).

Aun así, es importante notar que los diferentes esteroides y sus metabolitos presentes en las heces son específicos de cada especie, y que los niveles que son excretados a menudo representan solamente una fracción de la hormona en circulación (Whitten *et al.*, 1998). Al respecto, es importante resaltar que los ensayos aquí mencionados (RIA y SPCEI) podrían tener un desempeño diferente si se usara otro tipo de kits de anticuerpos comerciales disponibles en el mercado.

Las primeras comparaciones entre el Radioinmunoensayo y Quimioluminiscencia se efectuaron hace poco más de dos décadas para cuantificar esteroides sexuales femeninos en humanos con el objetivo de encontrar técnicas de ensayo que pudieran eliminar el uso de radioisótopos (Rojanasakul *et al.*, 1994). Aunque en dicha investigación no se compararon precisamente los mismos anticuerpos que en el actual

estudio, es interesante destacar que no se encontró una diferencia significativa entre los valores de estradiol obtenidos por los dos métodos. Mientras que los niveles de ciertas hormonas, progesterona entre ellas, registrados con Quimioluminiscencia fueron significativamente menores que con Radioinmunoensayo.

Lo anterior contrasta con lo reportado en la presente investigación, donde se halló justamente lo opuesto; un mejor desempeño del Radioinmunoensayo al leer estradiol, y mayor efectividad del ensayo por quimioluminiscencia para cuantificar progesterona. Esto subraya la importancia de validar estos métodos de lectura para cada especie en particular.

En química analítica, el principal objetivo es el empleo de métodos de análisis más rápidos, selectivos y sensibles. En la práctica, resulta muy difícil encontrar métodos analíticos que combinen estas cualidades y, en general, alguna de ellas debe ser sacrificada en beneficio de las otras. Al mismo tiempo, al analizar hormonas, la necesidad de determinar sustancias en cantidades muy pequeñas puede suponer el empleo de métodos costosos y que requieran capacitación especial del personal para manejar sustancias peligrosas.

En el caso específico del Radioinmunoensayo o RIA, la necesidad de contar con el equipo, material, laboratorio y personal certificado para el manejo de radioactividad entre otros factores, hacen que la técnica no siempre esté accesible a las necesidades de las instituciones interesadas en el estudio endocrinológico de esta especie, ya que factores como la conservación y transporte de las muestras en congelación hacia el laboratorio, el procesamiento de un número grande de muestras para disminuir los costos, entre otros, impide, en la mayoría de las veces que se tengan resultados de sólo un ejemplar en particular y/o en el momento requerido (Ziegler & Wittwer 2005).

Aunado a esto existen otras desventajas al usar radioisótopos como son el elevado costo, vigilancia de los desperdicios radioactivos y riesgos al personal técnico (Rojanasakul *et al.*, 1994). La técnica también representa un alto consumo de tiempo, lo cual no resulta apropiado si se trabaja en laboratorios en condiciones donde se alterne con el trabajo

clínico rutinario y sea necesaria la continua obtención de resultados de muestras de pacientes humanos.

Así, para poder determinar el método más apropiado para cuantificar un esteroide en particular, es indispensable ponderar qué se está buscando. También es importante considerar las condiciones de obtención de muestra en campo, almacenamiento, transporte y recursos disponibles en el laboratorio donde se llevarán a cabo los análisis posteriores.

La importancia de las validaciones químicas y fisiológicas específicas para cada especie se ha puesto de manifiesto en repetidas ocasiones por numerosas revisiones acerca del monitoreo no invasivo de hormonas en fauna silvestre (por ejemplo, Buchanan & Goldsmith, 2004; Palme, 2005; Touma & Palme, 2005; Wielebnowski & Watters, 2007). Aun así, las investigaciones que utilizan mediciones endocrinas además de observaciones de comportamiento y variables ambientales podrían no considerar completamente la importancia de la validación de los ensayos (Buchanan & Goldsmith, 2004). Aunque los kits de análisis disponibles comercialmente proporcionan algunos datos sobre la validación de inmunoensayos, esos resultados son relevantes solo para las especies y matrices probadas por el proveedor comercial. Por lo tanto, es necesario validar los ensayos para el uso en otra especie o en diferentes matrices (Buchanan & Goldsmith 2004; Palme, 2005).

El presente trabajo ha puesto de manifiesto muchas diferencias entre los estudios de las hormonas esteroides y también ha identificado temas comunes. Estos temas han proporcionado algunos de los principios y directrices básicos que permiten mejorar los futuros estudios que involucran la medida de las hormonas esteroides fecales y sus metabolitos en los primates mexicanos.

5.1.1. Sugerencias para futuros estudios

Una variable que podría influir de manera significativa los resultados obtenidos es el bajo número de muestras analizadas en las diferentes pruebas de validación, tanto analítica como fisiológica, ya que esto limita la potencia de las pruebas estadísticas. Originalmente se proyectó

manejar cinco muestras para cada prueba, pero debido a problemas con algunas muestras, éstas tuvieron que ser descartadas. En futuros trabajos, lo ideal sería tener un mayor número de muestras debido a que las diferencias individuales también podrían estar afectando los resultados. De igual forma, el número de diluciones debería ser mayor, para así poder obtener una curva dosis-respuesta más amplia.

Es interesante observar que para caracterizar metabolitos fecales es recomendable realizar cromatografía líquida de alta definición (HPLC) previo al análisis hormonal de todos los esteroides, como lo sugiere mucha de la literatura disponible (Lynch *et al.*, 2002; Lynch *et al.*, 2003; Stanczyk *et al.*, 2003; Van Belle *et al.*, 2009). Esto es debido a que después de la separación cromatográfica, la presencia de metabolitos inmunoreactivos en fracciones colectadas se determina con diferentes ensayos y, los metabolitos radiomarcados presentes son medidos. Este procedimiento ayuda a esclarecer cuáles metabolitos derivados de las hormonas están siendo medidos por los inmunoensayos aplicados (Whitten *et al.*, 1998; Bahr *et al.* 2000; Palme 2005; Ziegler & Wittwer, 2005, Rangel-Negrín *et al.* 2011; pero ver Hodges *et al.* 2010).

Es importante no dejar de lado que existen numerosos esteroides conjugados en la sangre, y que solamente un número pequeño de estos son probados con antisueros y están comercialmente disponibles como estándares para medir reacciones cruzadas (Stanczyk *et al.*, 2003). La consecuencia obvia es que la sensibilidad de los ensayos no está adecuadamente definida, y la determinación de la especificidad no es llevada a cabo a fondo por los fabricantes de kits de prueba de diagnóstico de hormonas (Stanczyk *et al.*, 2003). Por ejemplo, la validación de la especificidad de un ensayo está frecuentemente limitada a mostrar datos compuestos de posible interferencia; de cualquier forma, los metabolitos cuantitativamente importantes, especialmente los conjugados, usualmente no son incluidos. Existe una necesidad de demostrar la especificidad del ensayo comparando los resultados obtenidos con un kit con aquellos alcanzados mediante extracción o cromatografía. La falta de una validación adecuada de la sensibilidad y especificidad de un ensayo frecuentemente conduce a resultados poco confiables (Stanczyk *et al.*, 2003). Por esta razón es importante llevar a

cabo una vasta validación para cada kit previo a su aceptación para medir niveles hormonales en muestras de heces.

Por último, para complementar esta investigación, sería recomendable también realizar la validación analítica para cuantificar esteroides en suero y orina de esta misma especie; e igualmente comparar otros métodos de determinación hormonal existentes, como EIA; así como otros kits.

5.2 Respuesta frente a la variación en la disponibilidad de alimento

Se aplicaron técnicas no invasivas de determinación hormonal en muestras fecales a través de un estudio donde se examinaron las respuestas socio-endócrinas de un grupo de monos araña (*Ateles geoffroyi*) frente a la variación en la disponibilidad de alimento al que tenían acceso en condiciones de semi-cautiverio.

El presente estudio permitió poner a prueba las predicciones dirigidas a explorar los correlatos entre relaciones sociales, características del alimento y características grupales. El grupo de monos araña seleccionado vivía en condiciones de semicautiverio, estaba conformado por miembros de diferentes sexos y edades, y recibía aprovisionamiento alimenticio, el cual era posible modificar. El diseño experimental incluyó la manipulación en la disponibilidad del alimento que se ofrece a los individuos en función de la *calidad* de dicho alimento, con un registro de las interacciones sociales que ocurren durante la alimentación, además de la correlación de dichos registros con niveles de glucocorticoides fecales individuales, efectivos indicadores de estrés en *Ateles geoffroyi* (Rangel-Negrín *et al.*, 2009).

La *calidad* de la dieta en el experimento estaba dictada por la preferencia de ciertos alimentos respecto a otros. Esta preferencia coincide con estudios de preferencia de sabor en monos araña que muestran una respuesta preferencial a las concentraciones de azúcar más bajas que las detectadas por otros primates no humanos y sugieren que estas especies utilizan la dulzura como un criterio para la selección de

alimentos que se correlaciona con su especialización dietética (Laska *et al.*, 1996).

Otro factor importante que considerar en la preferencia por ciertos alimentos es la tendencia de los atélidos a comer pequeñas cantidades de alimento y dejar caer al suelo el resto, regresando a recuperar los restos más tarde (Wolfensohn & Honess 2005). Esta conducta se repitió a lo largo del estudio, lo cual no necesariamente refleja un rechazo a ciertos alimentos, sino una postergación de su consumo total, por lo que los registros espontáneos de alimentación fuera de la hora de aprovisionamiento también fueron tomados en cuenta durante los registros focales.

Mientras que ni la proximidad entre los individuos, ni las interacciones sociales se vieron afectadas por dicha variación en la disponibilidad del alimento bajo ninguna de las diferentes presentaciones; tanto los niveles de glucocorticoides, como el tiempo invertido en la alimentación por parte de cada uno de los individuos, sí se vieron influenciados por esta variable de manera significativa únicamente cuando el alimento se encontraba concentrado en una sola bandeja.

Cabe considerar que los primates jóvenes comúnmente imitan el comportamiento de forrajeo de los adultos, como la madre y los miembros mayores de la familia (Llorente 2019), de manera que, el patrón de alimentación de los individuos juveniles, especialmente el de la cría infante, podría estar influenciado por este factor. Este mismo elemento también podría explicar la notable disparidad en el tiempo dedicado al aprovisionamiento entre los individuos juveniles y la hembra adulta, madre de dichos juveniles, quien gozó de una cierta *prioridad* de acceso al alimento a lo largo del estudio, y como también se ha observado en otros primates platirrininos con estructuras sociales flexibles (De la Fuente *et al.*, 2018). Esto, junto con el consumo de alimentos no preferidos o la exploración a destiempo de los puntos de alimentación por parte de algunos individuos, podría formar parte de un conjunto de estrategias para evitar conflictos directos (Hessen *et al.*, 2014) cuando no existe la posibilidad de dispersarse en subgrupos para forrajear.

A lo largo del presente estudio la variación en las interacciones sociales no se vio afectada significativamente, aun cuando la disponibilidad del alimento estaba de forma agregada y no tenían la posibilidad de ajustar el tamaño del grupo para evitar la competencia trófica intragrupal, lo cual concuerda con el comportamiento poco agresivo de *Ateles geoffroyi* (Aureli & Schaffner 2008). No obstante, por lo general en las sociedades primates el tipo de competencia trófica tiene efectos en las relaciones sociales de los individuos (Janson 2000), como es el caso de los macacos japoneses (*Macaca fuscata*), que tienen altas probabilidades de presentar interacciones agonísticas cuando solamente hay un punto de recursos alimenticios disponible (Hanya 2009). Igualmente, la competencia por recursos en papiones oliva (*Papio anubis*) está relacionada con la distribución más que con la calidad del alimento y dicha competencia se incrementa durante la temporada seca, es decir cuando la disponibilidad de alimento es menor (Barton 1987). Asimismo, durante un experimento con manipulación en la distribución del alimento, Gore (1993) comparó las estrategias de alimentación de dos especies de cercopitécidos (*Macaca mulatta* y *Papio hamadryas*). Este estudio señaló que el tipo de vínculo afiliativo, específicamente entre hembras, así como el factor dominancia, determinan el tipo de competencia por recursos que despliega cada especie en particular. Las dos especies usaron estrategias diferentes para el mismo fin; los babuinos fueron más eficientes en la obtención de alimentos, mientras que los monos Rhesus tenían una estrategia de alimentación más flexible.

Como ya se ha mencionado, los períodos de escasez de alimentos, durante los cuales los individuos no pueden alimentarse de sus alimentos preferidos y, por lo tanto disminuyen su ingesta calórica, dan como resultado que muchos primates eleven los niveles de **glucocorticoides** para hacer frente a estos períodos de estrés nutricional, e.g. monos colobos rojos *Procolobus rufomitratus* (Chapman *et al.*, 2007), babuinos amarillos *Papio cynocephalus* (Gesquiere *et al.*, 2008), monos aulladores negros *Alouatta pigra* (Rangel-Negrín *et al.*, 2014b), y de manto *A. palliata* (Aguilar-Cucurachi *et al.*, 2010), lémures de cola

anillada *Lemur catta* (Cavigelli 1999) y sifacas de diadema *Propithecus diadema* (Tecot *et al.*, 2019).

Concretamente con el género *Ateles*, hasta ahora ha habido pocos estudios sobre cómo estas especies con dinámica fusión-fisión ajustan su comportamiento social y patrones de agrupación en fragmentos pequeños de bosque, o de qué manera la disponibilidad de alimentos influye en sus niveles de estrés fisiológico medido a través de los glucocorticoides fecales (i.e. Rimbach *et al.*, 2013, 2014; Ordoñez-Gómez *et al.*, 2016; Rodrigues 2017). Además, todas estas observaciones se han realizado en vida libre, sin controlar la disponibilidad de alimento. En el presente estudio, el análisis de la variación en los niveles de metabolitos glucocorticoides reflejó una competencia trófica intraespecífica, a pesar de la baja incidencia de interacciones agonísticas registradas entre los individuos durante el experimento.

Los resultados obtenidos gracias a los métodos no invasivos sugieren que la dispersión de los alimentos es un factor que podría disminuir las diferencias en la prioridad de acceso a los recursos alimenticios entre individuos de *Ateles geoffroyi*, lo que reduce las diferencias interindividuales durante las actividades tróficas y el estrés fisiológico causado por una baja disponibilidad del alimento. Si bien este estudio se realizó con un solo grupo pequeño de monos araña en semicautiverio, los resultados podrían extrapolarse a condiciones de libertad, donde el alimento se encuentra cada vez más concentrado en parches y menos disperso a lo largo del medio natural debido, principalmente, a perturbaciones de origen antropogénico.

5.2.1 Sugerencias para futuros estudios

Queda pendiente para futuras investigaciones determinar si el comportamiento y la respuesta de estrés fisiológico de los monos araña en condiciones de semi-cautiverio también se ven afectados por la variación temporal en la presentación de los alimentos, ya sea aumentando los intervalos de tiempo entre aprovisionamientos, o disminuyéndolos. Esta sería una variable interesante que considerar ya

que simularía más fielmente las condiciones naturales de la disponibilidad de alimento para estas especies.

Otra medida para mejorar el alcance de estos resultados dependerá inevitablemente del monitoreo a largo plazo. Aumentar el tiempo del estudio no sólo proporcionaría mayor cantidad de muestras fecales con la finalidad de medir las respuestas de estrés de los individuos a la variación en la disponibilidad de alimento, sino que también aumentaría el número de registros conductuales significativamente.

Otra manera de optimizar la comprensión del impacto de la variabilidad en la disponibilidad de alimento en esta especie es insertar otros tratamientos de manejo aparte de los utilizados en esta ocasión. Es decir, trazar combinaciones de presentación de los alimentos distintas a las ya utilizadas, ya sea de tamaño de bandejas, distancia entre ellas, incorporar alimentos nuevos o el grado de dispersión de estos.

El comportamiento de *Ateles*, específicamente las interacciones sociales o la competencia intrínseca por recursos observada en este estudio, también podrían estar influenciadas por la interacción con las hormonas esteroideas sexuales, como se ha descrito anteriormente en atélidos que viven bajo condiciones ambientales cambiantes, tanto en libertad como en cautiverio (Campbell *et al.*, 2001, 2004; Davis *et al.*, 2005; Cerda-Molina *et al.*, 2006, 2009; Cristóbal-Azkarate *et al.*, 2006; Van Belle *et al.*, 2009; Rangel-Negrín *et al.*, 2011b, Rodrigues *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2016), por lo que, para futuros estudios similares, sería interesante incluir también el análisis no invasivo de las hormonas reproductivas de los individuos.

Finalmente, se sugiere efectuar el mismo estudio en paralelo con otro grupo experimental, preferentemente configurado por individuos de varias edades y sexos. También sería interesante observar las variaciones en las respuestas fisiológicas y de comportamiento si la configuración de dicho grupo no estuviera constituida por miembros emparentados entre sí.

5.3 Partición de nichos isotópicos en dos especies simpátricas de monos aulladores

Por último, en el presente trabajo se aplicó un enfoque isotópico al estudio de la ecología trófica de dos especies de monos aulladores (*Alouatta palliata* y *A. pigra*). Se examinaron las proporciones de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en muestras de pelo pertenecientes a grupos silvestres de ambas especies presentes en diferentes localidades de México y Guatemala. Una vez obtenidos estos valores, se analizaron tanto la amplitud, como el solapamiento de los nichos isotópicos de cada especie en condiciones alopátricas y simpátricas.

Al igual que en otros estudios isotópicos en primates (Oelze *et al.*, 2011; Fahy *et al.*, 2013; Crowley *et al.*, 2014), primero se evaluó la variabilidad intraespecífica en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de acuerdo con el sexo de los individuos para descartar el sesgo en nuestros datos procedentes de esta variable. No se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras en ninguna de las especies, un resultado que es congruente con el comportamiento trófico de los monos aulladores (Bicca-Marques & Calegaro-Marques 1994; Glander & Teaford 1995; Pavelka & Knopff 2004).

A nivel de condición y especie, la variación en los valores isotópicos registró diferencias significativas a una escala refinada en el uso de recursos entre especies. *A. pigra* presentó niveles de $\delta^{13}\text{C}$ ligeramente más altos en alopatria y significativamente mayores de $\delta^{15}\text{N}$ en simpatria. En contraste, la SEAc de *A. palliata* no cambia sustancialmente, ya sea en condiciones alopátricas o simpátricas.

Las hojas de los árboles en general poseen bajas concentraciones de nitrógeno (Cork & Foley 1991), de manera que los niveles elevados de $\delta^{15}\text{N}$ de *A. pigra* en simpatria podrían deberse a un mayor consumo de frutos por parte de esta especie (Behie & Pavelka 2005; Dias & Rangel-Negrín 2015), o a la ingesta de fuentes enriquecidas en nitrógeno menos habituales que posiblemente ingieran cuando bajan a nivel del suelo, un comportamiento asociado a la necesidad de encontrar alimento que pueden desplegar estos primates cuando viven en hábitats

perturbados (Bicca-Marques 2003; Rodríguez-Toledo *et al.*, 2003; Pozo-Montuy & Serio-Silva 2007), o inclusive la ingesta fortuita de porciones del mismo suelo (Izawa 1993; Blake *et al.*, 2010).

Otra posible, aunque poco probable, explicación para los rangos isotópicos tan diferenciados entre especies, sobre todo de $\delta^{15}\text{N}$, podría ser el **efecto dosel**, un factor importante de la variación isotópica en hábitats tropicales relevantes en la interpretación isotópica en estudios con primates (Sandberg *et al.*, 2011, 2012). Esto apuntaría a una posible diferenciación en el nicho espacial (Gause 1934, Hutchinson 1957) entre estas dos especies en condiciones de simpatria, en la que *A. palliata* ingiera hojas tanto de la zona media como de la copa de los árboles, mientras que *A. pigra* consuma preferentemente hojas de la parte superior y/o más cerca del borde del fragmento (Crowley *et al.*, 2012).

Así pues, el rango de $\delta^{15}\text{N}$ de *A. pigra*, que duplica al de *A. palliata* en simpatria, repercute consecuentemente en la **amplitud del nicho isotópico**, que su vez, es un aproximado de la amplitud de nicho trófico (Bearhop *et al.*, 2004; Newsome *et al.*, 2007; Turner *et al.*, 2010). Cabe esperar que la amplitud trófica de *Alouatta pigra* cambie debido a su notable capacidad de explotar una amplia gama de recursos que proporcionan alta energía y que son difíciles de digerir. Estos resultados coinciden con estudios previos acerca de la amplitud trófica de esta especie. Dias *et al.* (2014) encontraron que la amplitud de dieta no estaba influenciada por los atributos vegetales del medio, sino más bien por el grado de folivoría de esta especie, es decir que las dietas más folívoras conducen a dietas más diversas.

Originalmente, se creía que los folívoros no estaban limitados por el alimento debido a que las hojas son superabundantes en los hábitats forestales. Sin embargo, se ha demostrado que los monos aulladores son sumamente selectivos en su alimentación, y que por lo general prefieren las hojas jóvenes de especies vegetales concretas (Pozo-Montuy & Serio-Silva 2006; Cristóbal-Azkarate & Arroyo-Rodríguez, 2007; Dias *et al.*, 2011). Aunque la morfología de los monos aulladores negros y de manto es similar (Kelaita *et al.*, 2011), se han descrito diferencias en las estrategias ecológicas de estas especies, siendo los aulladores negros quienes dedican más tiempo al consumo de frutas

que los aulladores de manto (Dias & Rangel-Negrín 2015). Los resultados aquí descritos confirman esta evidencia, ya que en las regiones alopatricas el ancho del nicho isotópico de estas especies fue similar pero no superpuesto. Por el contrario, en simpatria se observó una alta superposición de nicho entre las especies, aunque la amplitud de nicho de los aulladores de manto se conservó prácticamente igual que en alopatría.

Dado que los monos aulladores han sido descritos como los monos más folívoros del Nuevo Mundo (Crockett 1998) y con la mayor distribución que cualquier primate neotropical (Di Fiore *et al.*, 2010), era de esperar que no hubiera solapamiento de nichos isotópicos en el área de confluencia, donde justamente existe una degradación del hábitat más acusada (Dias *et al.*, 2013), y en consecuencia una baja disponibilidad de alimento, lo que a su vez, puede conducir fácilmente a estrés nutricional y derivar en niveles elevados de nitrógeno como en otros primates, incluido el ser humano (Gibson 2011; Crowley *et al.*, 2013; Neuberger *et al.*, 2013).

El uso de herramientas isotópicas ha sido previamente utilizado para comprender la plasticidad trófica (Streicker & Allgeier 2016), para documentar la relación entre nicho trófico y la perturbación antropogénica (Vennemann *et al.*, 2001; di Lascio *et al.*, 2013; Leichliter *et al.*, 2017) así como para describir la coexistencia de especies ecológicamente similares que convergen en un mismo paisaje (Dammhahn *et al.*, 2014, 2017; Hanane 2015; Lehmann *et al.*, 2015).

La segregación o partición de nicho trófico también ha sido materia de estudio en varias especies ecológicamente similares (Giménez *et al.*, 2017, 2018; Martín *et al.*, 2017). Sin embargo, el fenómeno de la exclusión competitiva es un tema poco abordado en Primatología (e.g. Masters 1985; Preuschoft & de Waal, 2001), siendo la mayor parte de los trabajos realizados con primates del Viejo Mundo (Sushma & Singh 2006; Beaudrot & Marshall 2011; Sandberg *et al.*, 2011; Dammhahn & Kappeler 2014; Bersicola *et al.*, 2015, Schäffler *et al.*, 2015; Balestri *et al.*, 2017; Polvadore *et al.*, 2017). En primates platirrinos la partición y solapamiento de hábitat se ha examinado en contadas ocasiones (e.g. Pontes 1997, Stevenson *et al.*, 2000). En particular, los resultados

obtenidos en el presente estudio contrastan con Agostini *et al.* (2010) quienes encontraron una superposición dietética inter e intraespecífica similar entre grupos de diferentes especies de monos aulladores durante todo el año, concluyendo que estas especies de *Alouatta* coexistentes son ecológicamente equivalentes.

Dado que *A. pigra* y *A. palliata* habitan en fragmentos con tamaño y forma similares, se puede suponer que el nicho isotópico más amplio de los aulladores negros no se debe a la alteración del hábitat, como se ha descrito para otros primates (e.g. langur de François *Trachypithecus francoisi*: Hu 2011), sino a la **interacción** con los aulladores de manto. En este contexto, los resultados obtenidos en este estudio apuntan a la inexistencia de un proceso de exclusión competitiva, ya que ambas especies de hecho coexisten en el área de simpatria. En todo caso, *A. pigra* parece ser capaz de desplegar una estrategia de forrajeo más generalista, y de esta manera ajustar su dieta para poder cohabitar con *A. palliata*. Queda pendiente para próximas investigaciones establecer los mecanismos detrás de la amplitud del nicho trófico de los aulladores negros en condiciones de simpatria.

Las interacciones directas y competitivas entre especies son de particular importancia para la estructura ecológica. Este estudio contribuyó significativamente al entendimiento de la coexistencia de estas especies ecológicamente similares con el fin de tener una base sobre la cual desarrollar nuevos proyectos para continuar esta línea de investigación centrada en la comprensión minuciosa de la ecología trófica de estas dos especies.

5.3.1 Sugerencias para futuros estudios

Aunque los monos aulladores habitan ecosistemas de bosques tropicales, que están dominados por vegetación C₃, lo cual establece un rango esperado de valores de $\delta^{13}\text{C}$, la naturaleza compleja de la variabilidad isotópica en los sistemas de plantas y animales hace de vital importancia el análisis de muestras vegetales del entorno para la interpretación integral de los valores isotópicos y el consiguiente espacio isotópico de cualquier especie (Blumenthal *et al.*, 2016). En este caso, la

toma de muestras de pelo no fue planeada originalmente con la finalidad de realizar estos análisis, por lo que no se contempló la recolección dichas muestras vegetales, siendo el obstáculo más evidente para explicar los resultados obtenidos. Por esta misma razón, el número de individuos muestreados en áreas de alopatria fue relativamente bajo en comparación a aquellos muestreados en simpatria, aspecto que podría considerarse para futuras ocasiones.

Por otro lado, la interacción entre las preferencias dietéticas, la disponibilidad de alimentos estacionales y el agotamiento de los parches alimentarios varía dentro y entre las especies en función de las características del hábitat. Para poder abordar la influencia de la heterogeneidad del hábitat, vinculada a la alteración antropogénica, sobre las proporciones isotópicas de las muestras, es necesario enriquecer el trabajo con mediciones de **fragmentación del paisaje** (Arroyo-Rodríguez *et al* 2013; Dias *et al.*, 2013).

Los fragmentos pequeños tienen menos fuentes de alimento que son adicionalmente más pequeñas (Arroyo-Rodríguez & Dias 2010). Como consecuencia, los aulladores comen menos frutas, más flores y otros alimentos, y sus dietas son menos diversas. Estos cambios en la dieta probablemente tienen un papel significativo sobre la amplitud de nicho trófico de las poblaciones de estos primates, en respuesta a la heterogeneidad del medio ambiente, como sucede con otras especies de primates (Loudon *et al.*, 2014).

Otro aspecto para considerar en futuros estudios es evaluar la variabilidad intraespecífica en $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ según la edad de los individuos para descartar sesgo por estos factores. Algunos estudios reportan que los patrones de comportamiento parecen aumentar el gasto de energía en los monos aulladores juveniles (Prates & Bicca-Marques 2008). Es posible que tal comportamiento resulte de una estrategia de forrajeo distintiva de los juveniles que incluya la ingesta de una amplia gama de tipos de alimento. Tal estrategia probablemente resulte crítica más adelante, durante el tiempo de aislamiento que los sub-adultos pasan después de emigrar de sus grupos natales y antes de formar parte de un nuevo grupo (Clarke 1990; Glander 1992). Durante ese tiempo, se ha informado que los individuos ocupan hábitats marginales, donde los

alimentos preferidos son probablemente más escasos, y la explotación de recursos alternativos puede ser crucial para la supervivencia.

Durante la captura de estos ejemplares, se suelen tomar mediciones morfométricas como parte del protocolo de muestreo (Rangel-Negrín *et al* 2011a). De esta manera, cabría vincular los datos morfométricos de los individuos con los valores isotópicos en pelo, con la finalidad de comprobar si están correlacionados con la condición física de los monos aulladores, como se ha documentado para otras especies de primates (Loudon *et al.*, 2007).

A nivel metodológico, no existe un método estandarizado para la correcta limpieza de muestras de pelo para estudios con isótopos estables. Típicamente, el pelo se limpia con algún tipo de solvente lipofílico o detergente antes del análisis, no obstante, el efecto de esta limpieza sobre los datos resultantes no se ha evaluado de forma crítica y aunque existen consideraciones técnicas generales (Oelze 2016), convendría validar el método de limpieza, como se ya se ha hecho para otros tejidos (i.e. Bontempo *et al.*, 2014).

También a un nivel metodológico, convendría obtener las muestras de pelo cuando están en la fase anágena; esto se logra tirando de cada pelo individualmente y con fuerza (Camacho *et al.*, 2013), de esta manera la firma isotópica será la más reciente y se conseguirá un alto grado de sincronía de crecimiento en la muestra.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el pelo refleja cambios en la dieta si estos son constantes a lo largo de varias semanas, como es el caso de estos primates que cambian de dieta estacionalmente. Considerando que la tasa de crecimiento de su pelo es de aproximadamente 1.8 mm semanales (Dias, comunicación personal), sería interesante realizar un análisis de la variabilidad intraindividual para observar estos cambios aprovechando que estos ejemplares presentan pelo relativamente largo y de crecimiento continuo. Una manera de hacerlo es realizando un análisis más detallado a través del análisis de **segmentos** de pelo por individuo a través de muestras escogidas aleatoriamente que reflejen tanto la estación de lluvias como la seca.

Por último, una aportación significativa al trabajo consistiría en contar con los valores isotópicos de otras especies de mamíferos

herbívoros arborícolas [(e.g. mono araña (*Ateles*), puercoespín de árbol (*Sphiggurus mexicanus*), martucha (*Potos flavus*)], terrestres [aguti (*Dasyprocta punctata*), venado temazate (*Mazama pandora*), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), conejo (*Sylvilagus sp.*), tapir (*Tapirus bairdii*)] u omnívoros [cacomixtle (*Bassariscus sumichrasti*), tamandua (*Tamandua mexicana*)] presentes en la misma zona y que enfrentan las mismas condiciones medioambientales (sensu Rangel-Negrín *et al.*, 2014a). Estos datos permitirían establecer los rangos isotópicos de la comunidad de la que forman parte estos primates en un contexto más amplio.

5.4 Referencias

- Agostini I, Holzmann I & Di Bitetti MS (2010) Are howler monkey species ecologically equivalent? Trophic niche overlap in syntopic *Alouatta guariba clamitans* and *Alouatta caraya*. *American Journal of Primatology*, 72, 173–186.
- Aguilar MAE (2010). Principal Glucocorticoide sérico y fecal en mono aullador negro (*Alouatta pigra*) del estado de Campeche. Tesis de Maestría. Instituto de Neuroetología. Universidad Veracruzana. México.
- Aguilar-Cucurachi MS, Dias PAD, Rangel-Negrín A, Chavira R, Boeck L & Canales-Espinosa D (2010). Preliminary evidence of accumulation of stress during translocation in mantled howlers. *American Journal of Primatology*, 72(9), 805-810.
- Arroyo-Rodríguez V, Cuesta-del Moral E, Mandujano S, Chapman CA, Reyna-Hurtado R & Fahrig L (2013) Assessing Habitat Fragmentation Effects on Primates: The Importance of Evaluating Questions at the Correct Scale. En: L.K. Marsh and C.A. Chapman (Eds.), *Primates in Fragments: Complexity and Resilience, Developments in Primatology: Progress and Prospects*, Springer Science+Business Media New York.
- _____ & Dias PAD (2010) Effects of habitat fragmentation and disturbance on howler monkeys: a review. *American Journal of Primatology*, 72,1–16.
- Bahr NI, Palme R, Möhle U, Hodges JK & Heistermann M (2000) Comparative aspects of the metabolism and excretion of cortisol in three individual non-human primates. *Gen Comp Endocrinol* 117:427–438.
- Balestri M, Campera M, Nekaris KAI & Donati G (2017) Exploring Niche Partitioning in Strepsirrhines: *Lepilemur fleuretae* and *Avahi meridionalis* in the Lowland Rainforest of Southeastern Madagascar. *Folia Primatol.* 88, 2:111-111.
- Barton RA (1987) Feeding strategies of olive baboons (*Papio anubis*). *Int J Primatol* 8, 467.

- Bearhop S, Adams CE, Waldron S, Fuller RA & Macleod H (2004). Determining trophic niche width: A novel approach using stable isotope analysis. *Journal of Animal Ecology*, 73, 354 1007–1012.
- Beaudrot LH & Marshall AJ (2011) Primate communities are structured more by dispersal limitation than by niches. *Journal of Animal Ecology*, 80(2): 332-341.
- Behie AM & Pavelka MSM (2005) The short-term effect of Hurricane Iris on the diet and activity of black howlers (*Alouatta pigra*) in Monkey River, Belize. *Folia Primatologica* 76:1–9.
- Behringer V & Deschner T (2017) Non-invasive monitoring of physiological markers in primates. *Hormones and Behavior*, 91, 3-18.
- Bersacola E, Svensson MS & Bearder SK (2015) Niche Partitioning and Environmental Factors Affecting Abundance of Strepsirrhines in Angola. *American Journal of Primatology* 77:1179–1192.
- Bertoli P, Culot L, Palme R & Mendoça-Furtado O (2019) Measuring fecal glucocorticoid metabolites of an endangered Neotropical primate: technical details of a physiological validation. *Boletim da sociedade Brasileira de Mastozoologia*, 80: 1-6.
- Bicca-Marques JC (2003). How do howler monkeys cope with habitat fragmentation? En: L.K. Marsh, (Ed.), *Primates in fragments: ecology and conservation* (p 283–303). New York: Kluwer Academics/Plenum Publishers.
- _____ & Calegario-Marques C (1994). Activity budget and diet of *Alouatta caraya*: an age-sex analysis. *Folia Primatologica*, 63, 216–220.
- Blake JG, Guerra J, Mosquera D, Torres R, Loiselle BA & Romo D (2010) Use of Mineral Licks by White-Bellied Spider Monkeys (*Ateles belzebuth*) and Red Howler Monkeys (*Alouatta seniculus*) in Eastern Ecuador. *Int J Primatol* 31: 471.
- Blumenthal SA, Rothman JM, Chritz KL & Cerling TE (2016). Stable isotopic variation in tropical forest plants for applications in primatology. *American Journal of Primatology*, 78, 1041–1054.
- Bontempo L, Ceppa F, Ziller L, Pedrini P, Hobson KA, Wassenaar LI & Camin F (2014). Comparison of methods for stable isotope ratio ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{18}\text{O}$) measurements of feathers. *Methods in Ecology and Evolution* 2014, 5, 363–371.

- Buchanan KL & Goldsmith AR (2004) Noninvasive endocrine data for behavioural studies: the importance of validation. *Anim. Behav.* 67:183–185.
- Camacho FM, Tosti A, Randall VA & Price VH (2013) Tricología. enfermedades del folículo pilosebáceo. Libros Princeps. Biblioteca Aula Médica. Vol 1. Tercera edición. Madrid. p 143-146.
- Campbell CJ (2004) Patterns of behavior across reproductive states of free-ranging female black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). *Am J Phys Anthropol.* 124(2): 166-176.
- _____, Shideler SE, Todd HE & Lasley BL (2001) Fecal analysis of ovarian cycles in female black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). *Am J Primatol* 54(2): 79-89.
- Cavigelli SA (1999) Behavioural patterns associated with faecal cortisol levels in free-ranging female ring-tailed lemurs, *Lemur catta*. *Animal Behaviour*, 57:935–944.
- Cerda-Molina AL, Hernández-López L, Pérez-Ponce DL, Rojas-Maya S & Mondragón-Ceballos R (2006) Seasonal Variations of Fecal Progesterone and 17 β -Estradiol in Captive Female Black-Handed Spider Monkeys (*Ateles geoffroyi*). *Theriogenology*, 66: 1985-1993.
- _____, Hernández-López L, Chavira-Ramírez R, Cárdenas M & Mondragón-Ceballos R (2009) Seasonality of LH, Testosterone and Sperm Parameters in Spider Monkey Males (*Ateles geoffroyi*). *Am J Primatol* 71:427-431.
- Chapman CA, Rothman JM & Lambert JE (2012) Food as a Selective Force in Primates. En: (Eds) J.C. Mitani, J. Call, P.M. Kappeler, R.A. Palombit, and J. B. Silk. *The Evolution of Primate Societies*. The University of Chicago Press, Ltd., London, p.149-168.
- _____, Saj TL & Snaith TV (2007) Temporal dynamics of nutrition, parasitism, and stress in colobus monkeys: implications for population regulation and conservation. *American Journal of Physical Anthropology* 134:240–250.
- _____, Wrangham RW & Chapman LJ (1995) Ecological constraints on group size: an analysis of spider monkey and chimpanzee subgroups. *Behavioural Ecology and Sociobiology*, 36, 59–70.

- Clarke MR (1990) Behavioral development and socialization of infants in a free-ranging group of howling monkeys (*Alouatta palliata*). *Folia Primatologica*, 54, 1–15.
- Cork SJ & Foley WJ (1991) Digestive and Metabolic strategies of arboreal mammalian folivores in relation to chemical defenses in temperate and tropical forests. En: Palo TR, Robbins CT (eds) Plant defenses against mammalian herbivory. CRC Press, Boca Raton, p 133-166.
- Cristóbal-Azkarate J & Arroyo-Rodríguez V (2007) Diet and activity pattern of howler monkeys (*Alouatta palliata*) in Los Tuxtlas, Mexico: effects of habitat fragmentation and implications for conservation. *Am J Primatol* 69:1013–1029.
- _____, Chavira R, Boeck L, Rodríguez-Luna & Veà JJ (2006) Testosterone levels of free ranging resident mantled howlers males in relation to the number and density of solitary males: a test of the challenge hypothesis. *Hormones and Behaviour*, 49: 261-267.
- Crockett CM (1998) Conservation biology of the genus *Alouatta*. *Int J Primatol* 19: 549-578.
- Crowley BE, Blanco MB, Arrigo-Nelson SJ & Irwin MT (2013). Stable isotopes document resource partitioning and effects of forest disturbance on sympatric cheirogaleid lemurs. *Naturwissenschaften* 100, 943–956.
- _____, Mc Googan K & Lehman SM (2012) Edge Effects on Foliar Stable Isotope Values in a Madagascan Tropical Dry Forest. *PLoS ONE* 7(9): e44538.
- _____, Rasoazanabary E & Godfrey LR (2014) Stable isotopes complement focal individual observations and confirm dietary variability in reddish-gray mouse lemurs (*Microcebus griseorufus*) from southwestern Madagascar. *American Journal of Physical Anthropology* 155:77–90.
- Cucherousset J & Villéger S (2015) Quantifying the multiple facets of isotopic diversity: New metrics for stable isotope ecology. *Ecological Indicators* 56: 152–160.
- Dammhahn M & Goodman SM (2014) Trophic niche differentiation and microhabitat utilization revealed by stable isotope analyses in a

- dry-forest bat assemblage at Ankarana, northern Madagascar. *Journal of Tropical Ecology*, 30(2), 97-109.
- ____ & Kappeler PM (2014) Stable Isotope Analyses Reveal Dense Trophic Species Packing and Clear Niche Differentiation in a Malagasy Primate Community. *Am J Phys Anthropol* 153:249–259.
- ____, Randriamoria TM & Goodman SM (2017) Broad and flexible stable isotope niches in invasive non-native *Rattus* spp. in anthropogenic and natural habitats of central eastern Madagascar. *BMC ecology*, 17(1), 16.
- Davis N, Schaffner CM & Smithe T (2005) Evidence that Zoo visitors influence HPA Activity in Spider Monkeys (*Ateles geoffroyi rufiventris*). *Applied Animal Behavioral Science*, 90:131-141.
- De la Fuente MF, Schiel N, Bicca-Marques JC, Caselli CB, Souto A & Garber PA (2018) Balancing contest competition, scramble competition, and social tolerance at feeding sites in wild common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Am J Primatol*. 2019;81: e22964.
- Di Fiore A, Link A & Campbell CJ (2010) The atelines: behavioral and socioecological diversity in a New World radiation. In: Campbell CJ, Fuentes AF, MacKinnon KC, Bearder S, Stumpf R (eds) *Primates in perspective*, 2nd edn. Oxford University Press, New York. p 155–188.
- di Lascio A, Rossi L, Carlino P, Calizza E, Rossi D & Costantini ML (2013) Stable isotope variation in macroinvertebrates indicates anthropogenic disturbance along an urban stretch of the river Tiber (Rome, Italy). *Ecological indicators*, 28, 107-114.
- Dias PAD, Alvarado-Serrano D, Rangel-Negrín A, Canales-Espinosa D & Cortés-Ortiz L (2013) Landscape Attributes Affecting the Natural Hybridization of Mexican Howler Monkeys. En: L.K. Marsh and C.A. Chapman (Eds.), *Primates in Fragments: Complexity and Resilience, Developments in Primatology: Progress and Prospects*. Springer, New York.
- ____, Coyohua-Fuentes A, Canales-Espinosa D, Chavira-Ramírez R & Rangel-Negrín A (2017) Hormonal correlates of energetic condition in mantled howler monkeys. *Hormones and Behavior* 94: 13-20.

- _____, Coyohua-Fuentes A, Canales-Espinosa D & Rangel-Negrín A (2016) Factors influencing the reproductive success of female black howler monkeys (*Alouatta pigra*). *International Journal of Primatology* 37:638–655.
- _____, Coyohua A, Rangel-Negrín A & Canales-Espinosa D (2011) Plants consumed by black howlers in the state of Campeche, Mexico. In: Gama-Campillo L, Pozo-Montuy G, Contreras-Sánchez WM, Arriaga-Weiss SL, eds. *Perspectivas en Primatología Mexicana*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa (ISBN: 978-607-7557-81-4). P. 27–46
- _____ & Rangel-Negrín A (2015) Diets of howler monkeys. In: Kowalewski M, Garber P, Cortés-Ortiz L, Urbani B, Youlatos D (eds) *Howler monkeys: behavior, ecology and conservation*. Springer, New York.
- _____, Rangel-Negrín A, Coyohua-Fuentes A & Canales-Espinosa D (2014) Variation in Dietary Breadth among Groups of Black Howler Monkeys is Not Associated with the Vegetation Attributes of Forest fragments. *Am. J. Primatol.* 76:1151–1162.
- Fahy GE, Richards MP, Riedel J, Hublin JJ & Boesch C (2013) Stable isotope evidence of meat eating and hunting specialization in adult male chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:5829–5833.
- Foerster S & Monfort SL (2010) Fecal glucocorticoids as indicators of metabolic stress in female Sykes' monkeys (*Cercopithecus mitis albogularis*). *Hormones and Behavior*, 58(4): 685-697.
- Gause GF (1934) *The struggle for existence*. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Gesquiere LR, Khan M, Shek L, Wango TL, Wango EO, Alberts SC & Altmann J (2008) Coping with a challenging environment: effects of seasonal variability and reproductive status on glucocorticoid concentrations of female baboons (*Papio cynocephalus*). *Hormones and Behavior* 54:410–416.
- Gibson L (2011) Possible shift in macaque trophic level following a century of biodiversity loss in Singapore. *Primates*, 52, 217–220.

- Giménez J, Cañadas A, Ramírez F, Afán I, García-Tiscar S, Fernández-Maldonado C, Castillo JJ & de Stephanis R (2017) Intra-and interspecific niche partitioning in striped and common dolphins inhabiting the southwestern Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 567, 199-210.
- _____, Cañadas A, Ramírez F, Afán I, García-Tiscar S, Fernández-Maldonado C, Castillo JJ & de Stephanis R (2018). Living apart together: Niche partitioning among Alboran Sea cetaceans. *Ecological indicators*, 95, 32-40.
- Glander KE (1992). Dispersal patterns in Costa Rican mantled howler monkeys. *International Journal of Primatology*, 13, 415–436.
- _____, & Teaforde ME (1995) Seasonal, sexual, and habitat effects on feeding rates of *Alouatta palliata*. *American Primatology*, 36, 124–125.
- Hanane S (2015) Nest-niche differentiation in two sympatric *Streptopelia* species from a North African agricultural area: the role of human presence. *Ecological Research*, 30(4): 573-580.
- Hanya G (2009) Effects of food type and number of feeding sites in a tree on aggression during feeding in wild *Macaca fuscata*. *Int J Primatol* 30: 569–581.
- Hernández MSE, Portillo LB, Valdéz RA, Brousset HJDM & Romano PM (2006). Determinación de estacionalidad reproductiva en ocelotes (*Leopardus pardalis*) hembras y machos mantenidas en cautiverio por medio de Radioinmunoanálisis en heces. Memorias del Taller de Técnicas no invasivas para la evaluación del estado de salud y bienestar en animales silvestres. Dpto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias CINVESTAV, DGZCM, UNAM. México.
- Hessen M, Rogahn S, Macdonald S, Ostner J & Schülke O (2014) Predictors of food-related aggression in wild Assamese macaques and the role of conflict avoidance. *Behav Ecol Sociobiol* 68:1829–1841.
- Hodges K, Brown J & Heistermann M (2010) Endocrine monitoring of reproduction and stress. En: Kleiman DG, Thompson KV, Kirk Baer C (eds) Wild mammals in captivity: principles and techniques for zoo management. The University of Chicago Press, Chicago, p. 447–468.

- Hu G (2011) Dietary breadth and resource use of François' langur in a seasonal and disturbed habitat. *American Journal of Primatology*, 73: 1176–1187.
- Hunt KE, Trites AW & Wasser SK (2004). Validation of a fecal glucocorticoid assay for Stellar sea lions (*Eumetopias jubatus*). *Physiol. Behav.* 80: 595–601.
- Hutchinson GE (1957) Population studies-animal ecology and demography-concluding remarks. En: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology (p. 415-427). New York: Cold Spring Harbor Lab Press.
- IUCN (2012) IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2012.2. www.iucnredlist.org. Consultado 9 Jun 2019.
- Izawa K (1993) Soil-eating by *Alouatta* and *Ateles*. *International Journal of Primatology* 14: 229.
- Janson CH (2000) Primate Socio-Ecology: The End of a Golden Age. *Evolutionary Anthropology* p. 73-86.
- Koenig A & Borries C (2006). The predictive power of socioecological models: A reconsideration of resource characteristics, agonism and dominance hierarchies. En *Feeding Ecology in Apes and Other Primates* (ed. by Hohmann, G., Robbins, M. M. & Boesch, C.), 263– 284. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kelaita M, Dias PAD, Aguilar-Cucurachi MS, Canales-Espinosa D & Cortés-Ortiz L (2011). Impact of intrasexual selection on sexual dimorphism and testes size in the Mexican howler monkeys *Alouatta palliata* and *A. pigra*. *American Journal of Physical Anthropology*, 146(2), 179-187.
- Laska M, Sánchez EC, Rivera JAR & Luna ER (1996) Gustatory thresholds for food-associated sugars in the spider monkey (*Ateles geoffroyi*). *Am. J. Primatol.* 39:189-193.
- Lehmann D, Mfuné JKE, Gewers E, Brain C & Voigt CC (2015) Individual variation of isotopic niches in grazing and browsing desert ungulates. *Oecologia*, 179(1), 75-88.
- Leichliter JN, Sandberg P, Sponheimer MJ, Passey B, Avenant N, Paine O, Codron D & Codron J (2017) Exploring the Utility of Carbon

- Isotope Analyses of Small Mammal Tooth Enamel as an Environmental Proxy. 86th Annual Meeting of the American-Association-of-Physical-Anthropologists (AAPA) New Orleans, American Journal of Physical Anthropology 162(64): 260.
- Llorente M (2019) Primates. Biología, comportamiento y evolución. Lynx Edicions. Barcelona.
- Loudon JE, Grobler JP, Sponheimer M, Moyer K, Lorenz JG & Turner TR (2014). Using the stable carbon and nitrogen isotope compositions of vervet monkeys (*Chlorocebus pygerythrus*) to examine questions in ethnoprimateology. *PLoS One*, 9, e100758.
- _____, Sponheimer M, Sautther ML & Cuzzo FP (2007). Intraspecific variation in hair $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of ring-tailed lemurs (*Lemur catta*) with known individual histories, behavior, and feeding ecology. *American Journal of Physical Anthropology*, 133, 978–985.
- Lynch JW, Ziegler TE & Strier KB (2002). Individual and seasonal variation in fecal testosterone and cortisol levels of wild male tufted capuchin monkeys, *Cebus apella nigratus*. *Horm. Behav.* 41:275–287.
- _____, Khan MZ, Altmann J, Njahira MN & Rubenstein N (2003). Concentrations of four fecal steroids in wild baboons: short-term storage conditions and consequences for data interpretation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132:264-271.
- Martín N, Martínez S, Pujol-Buxó E, Viñolas A, Llorente GA, Sanpera C, Vasconcelos R, Carranza S & Santos X (2017) Stable isotopes and diet uncover trophic-niche divergence and ecological diversification processes of endemic reptiles on Socotra Island. *Zoologischer Anzeiger* 267:69–81.
- Martínez-Mota R, Valdespino C, Sánchez-Ramos MA & Serio-Silva JC (2007). Effects of forest fragmentation on the physiological stress response of black howler monkeys. *Anim. Conserv.* 10:374–379.
- _____, Valdespino C, Rivera Revollo JA & Palme R (2008) Determination of fecal glucocorticoid metabolites to evaluate stress response in *Alouatta pigra*. *Int. J. Primatol.* 29:1365-1373.

- Maters JC (1985) Pottos and bushbabies: A palaeoclimatic approach to the question of competitive exclusion. *South African Journal of Science*. 81(11). Pgs: 691.
- Neuberger FM, Jopp E, Graw M, Püschel K & Grupe G (2013). Signs of malnutrition and starvation—Reconstruction of nutritional life histories by serial isotopic analyses of hair. *Forensic Science International*, 226(1-3), 22-32.
- Newsome SD, Martínez del Río C, Bearhop S & Phillips DL (2007). A niche for isotopic ecology. *Frontiers in Ecology and Environment*, 5, 429–436.
- Oelze VM (2016). Reconstructing temporal variation in great ape and other primate diets: a methodological framework for isotope analyses in hair. *American Journal of Primatology*, 78(10), 1004-1016.
- , Fuller BT, Richards MP, Fruth B, Surbeck M, Hublin J-J & Hohmann G (2011) Exploring the contribution and significance of animal protein in the diet of bonobos by stable isotope ratio analysis of hair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 9792–9797.
- Ometto JPH, Ehleringer JR, Domingues T, Berry JA, Ishida FY, Mazzi E, Higuchi N, Flanagan LB, Nardoto GB & Martinelli LA (2006) The stable carbon and nitrogen isotopic composition of vegetation in tropical forests of the Amazon Basin, Brazil. *Biogeochemistry* 79:251–274.
- Ordóñez-Gómez JD, Cristóbal-Azkarate J, Arroyo-Rodríguez V, Santillán-Doherty AM, Valdez RA & Romano MC (2016) Proximal and Distal Predictors of the Spider Monkey's Stress Levels in Fragmented Landscapes. *PLoS ONE* 11(2): e0149671.
- Palme R (2005) Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1046:75–80.
- Pavelka MSM & Knopff K (2004) Diet and activity in black howler monkeys (*Alouatta pigra*) in southern Belize: does degree of frugivory influence activity level? *Primates*, 45, 105–111.
- Polvadore TA, Kane EE, Wilkins MA, Gnepa FM, Daegling DJ & McGraw WS (2017) Niche Partitioning, Diet, and Oral Processing Behaviors in Three Sympatric Guenons in the Tai National Park,

- Cote d'Ivoire. 86th Annual Meeting of the American-Association-of-Physical-Anthropologists (AAPA). *Am J Phys Anthropol.* 162(64): 319-319.
- Pontes ARM (1997) Habitat Partitioning Among Primates in Maracá Island, Roraima, Northern Brazilian Amazonia. *International Journal of Primatology* 18(2): 131-157.
- Pozo Montuy G & Serio-Silva JC (2006) Comportamiento alimentario de monos aulladores negros (*Alouatta pigra* Lawrence, Cebidae) en hábitat fragmentado en Balancán, Tabasco, México. *Acta Zoológica Mexicana* (nueva serie) 22(3): 53-66.
- _____ & Serio-Silva JC (2007) Movement and resource use by a troop of *Alouatta pigra* in a forest fragment in Balancán, Mexico. *Primates* 48:102–107.
- Prates HM & Bicca-Marques JC (2008). Age-sex analysis of activity budget, diet, and positional behavior in *Alouatta caraya* in an orchard forest. *International Journal of Primatology*, 29(3): 703-715.
- Preuschoft S & de Waal F (2001) Food sharing and competitive exclusion in chimpanzees: Experimental manipulation of risks and stakes. The 18th Congress of the International Primatological Society. Primates in the new millennium. Abstracts and Programme. Adelaide: IPS p 431.
- Ramírez-Saldivar DA (2007). Estimación del consumo de materia seca promedio, digestibilidad aparente, tasa de pasaje y aporte nutricional de la dieta del mono saraguato (*Alouatta spp.*) ofrecida en el Zoológico San Juan de Aragón. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México.
- Rangel-Negrín A, Alfaro JL, Valdez RA, Romano MC & Serio-Silva JC (2009) Stress in Yucatan spider monkeys: effects of environmental conditions on fecal cortisol levels in wild and captive populations. *Animal Conservation* 12: 496–502.
- _____, Coyohua-Fuentes A, Canales-Espinosa D & Dias PAD (2014a) Mammal assemblages in forest fragments and landscapes occupied by black howler monkeys. *Primates*, 55(3), 345-352.
- _____, Coyohua-Fuentes A, Chavira R, Canales-Espinosa D & Dias PAD (2014b) Primates Living Outside Protected Habitats Are

- More Stressed: The Case of Black Howler Monkeys in the Yucatán Peninsula. *PLoS ONE* 9(11): e112329.
- _____, Dias PAD & Canales-Espinosa D (2011a) Impact of translocation on the behavior and health of black howlers. En: Gama-Campillo L, Pozo-Montuy G, Contreras-Sánchez WM, ArriagaWeiss SL, eds. *Perspectivas en Primatología Mexicana*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa (ISBN: 978-607-7557-81-4). P. 271–288.
- _____, Dias PAD, Chavira R & Canales-Espinosa D (2011b) Social modulation of testosterone in male black howlers (*Alouatta pigra*). *Horm Behav* 59:159–166.
- Rimbach R, Heymann EW, Link A & Heistermann M (2013) Validation of an enzyme immunoassay for assessing adrenocortical activity and evaluation of factors that affect levels of fecal glucocorticoid metabolites in two New World primates. *General and Comparative Endocrinology* 191:13–23.
- _____, Link A, Montes-Rojas A, Di Fiore A, Heistermann M & Heymann EW (2014) Behavioral and Physiological Responses to Fruit Availability of Spider Monkeys Ranging in a Small Forest Fragment. *American Journal of Primatology* 76:1049–1061.
- Rodrigues MA (2017) Female Spider Monkeys (*Ateles geoffroyi*) Cope with Anthropogenic Disturbance Through Fission–Fusion Dynamics. *Int J Primatol*, 38(5): 838–855.
- _____, Wittwer DJ & Kitchen DM (2015) Measuring Stress Responses in Female Geoffroy's Spider Monkeys: Validation and the Influence of Reproductive State. *Am J Primatol*. 77(9): 925-935.
- Rodriguez-Toledo EM, Mandujano S & García-Orduña F (2003). Relationships between forest fragments and howler monkeys (*Alouatta palliata mexicana*) in southern Veracruz, Mexico. En: L.K. Marsh, *Primates in Fragments* (p. 79-97). Boston: Springer.
- Rojanasakul A, Udomsubpayakulb U & Chinsomboon S (1994). Chemiluminescence immunoassay versus radioimmunoassay for the measurement of reproductive hormones. *Int. J. Gynecol. Obstet*. 45:141-146.

- Sandberg P, Loudon JE & Sponheimer M (2012) Stable Isotope Analysis in Primatology: A Critical Review. *American Journal of Primatology*, 74, 969–989.
- _____, Mertz E & Sponheimer M (2011) The canopy effect: new carbon isotope data from an eastern lowland rainforest in Madagascar and implications for assessing primate niche partitioning. 80th Annual Meeting of the American-Association-of-Physical-Anthropologists. *Am J of Phys Anthropol*. 144(52): 261-262.
- Schäffler L, Saborowski J & Kappeler PM (2015) Agent-mediated spatial storage effect in heterogeneous habitat stabilizes competitive mouse lemur coexistence in Menabe Central, Western Madagascar. *BMC Ecology*, 15(7).
- Snaith TV & Chapman CA (2007) Primate group size and socioecological models: Do folivores really play by different rules? *Evolutionary Anthropology*, 16: 94–106.
- Stanczyk FZ, Cho MM, Endres DB, Morrison JL, Patel S & Paulson RJ (2003). Limitations of direct estradiol and testosterone immunoassay kits. *Steroids* 68:1173–1178.
- Sterck EHM, Watts DP & van Schaik CP (1997) The evolution of female social relationships in nonhuman primates. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 41: 291–309.
- Stevenson PR, Quinones MJ & Ahumada JA (2000) Influence of fruit availability on ecological overlap among four Neotropical primates at Tinigua National Park, Colombia. *Biotropica* 32(3): 533-544.
- Streicker DG & Allgeier JE (2016) Foraging choices of vampire bats in diverse landscapes: potential implications for land-use change and disease transmission. *Journal of Applied Ecology*, 53(4): 1280-1288.
- Strier KB & Ziegler TE (1997). Behavioral and endocrine characteristics of the reproductive cycle in wild muriqui monkeys, *Brachyteles arachnoides*. *American Journal of Primatology*, 42(4): 299-310.
- Sushma HS & Singh M (2006) Resource partitioning and interspecific interactions among sympatric rain forest arboreal mammals of the Western Ghats, India. *Behavioral Ecology*, 17(3): 479-490.

- Tecot SR, Irwin MT & Raharison J-L (2019) Faecal glucocorticoid metabolite profiles in diademed sifakas increase during seasonal fruit scarcity with interactive effects of age/sex class and habitat degradation. *Conserv Physiol* 7(1).
- Touma C & Palme R (2005) Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1046:54–74.
- Turner TF, Collyer ML & Krabbenhoft TJ (2010). A general hypothesis-testing framework for stable isotope ratios in ecological studies. *Ecology*, 91, 2227–2233.
- Van Belle S, Estrada A, Ziegler TE & Strier KB (2009) Sexual behavior across ovarian cycles in wild black howler monkeys (*Alouatta pigra*): Male mate guarding and Female mate choice. *American Journal of Primatology*, 71:153-164.
- Vennemann TW, Hegner E, Cliff G & Benz GW (2001) Isotopic composition of recent shark teeth as a proxy for environmental conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65(10), 1583-1599.
- Wasser SK & Hunt KE (2005). Noninvasive measures of reproductive function and disturbance in the barred owl, great horned owl, and northern spotted owl. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1046: 109-137.
- _____, Hunt KE, Brown JL, Cooper K, Crockett CM, Bechert U, Millsaugh JJ, Larson S & Monfort SL (2000) A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120: 260-275.
- _____, Thomas R, Nair PP, Guidry C, Southers J, Lucas J, Wildt DE & Monfort SL (1993). Effects of dietary fibre on fecal steroid measurements in baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus*). *J. Rep. Fert.* 97: 569–574.
- Whitten PL, Stavisky R, Aureli F & Russell E (1998). Response of fecal cortisol to stress in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Am. J. Primatol.* 44:57–69.
- Wielebnowski N & Watters J (2007) Applying fecal endocrine monitoring to conservation and behavior studies of wild mammals: important considerations and preliminary tests. *Isr. J. Ecol. Evol.* 53: 439–460.

- Wolfensohn S & Honess P (2005) Handbook of Primate Husbandry and Welfare. Blackwell Publishing Ltd. Oxford UK.
- Young KM, Walker SL, Lanthier C, Waddell WT, Monfort SL & Brown JL (2004). Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. *Gen. Comp. Endocrinol.* 137:148–165.
- Ziegler TE, Hodges K, Winkler P & Heistermann M (2000). Hormonal correlates of reproductive seasonality in wild female hanuman langurs (*Presbytis entellus*). *Am. J. Primatol.* 51: 119–134.
- _____, Santos CV, Pissinatti A & Strier KB (1997) Steroid excretion during the ovarian cycle in captive and wild muriquis, *Brachyteles arachnoides*. *Am J of Primatol* 42(4): 311-321.
- _____ & Wittwer DJ (2005). Fecal steroid research in the field and laboratory: improved methods for storage, transport, processing, and analysis. *Am. J. Primatol.* 67: 159-174.

Capítulo 6

Conclusiones generales

1. Este trabajo proporciona bases metodológicas para el estudio no invasivo de las hormonas esteroides en las heces de mono aullador negro (*Alouatta pigra*), especie en peligro de extinción. Las validaciones analíticas y fisiológicas realizadas demuestran que los kits comerciales actualmente disponibles permiten un monitoreo endocrino correcto de esta y otras especies de primates, y que existen alternativas no farmacológicas para evaluar la validez fisiológica de las mediciones hormonales.
2. Al comparar los resultados de los dos métodos de extracción empleados en este estudio, resaltó que ambos mostraron porcentajes de recuperación similares en las cuatro hormonas analizadas, promediando 55.3%, de manera que los diluyentes etanol y metanol utilizados para la extracción hormonal en heces de *A. pigra*, son equiparables.
3. Las funciones fisiológicas de las hormonas esteroides que se midieron en las heces de esta especie se pueden determinar a través de validaciones no farmacológicas. En este sentido, se demostró que: (1) las comparaciones entre situaciones previas y posteriores al estrés pueden usarse para evaluar la respuesta al cortisol, (2) las comparaciones entre machos y hembras pueden usarse para evaluar la variación en los niveles de testosterona, y (3) pueden usarse comparaciones entre hembras embarazadas y no embarazadas para determinar la variación en la actividad de estradiol y progesterona.
4. El método más adecuado para determinar progesterona y estradiol en heces de *A. pigra* es el Radioinmunoensayo (RIA), mientras que, para la cuantificación de progesterona y testosterona, tanto el RIA como el inmunoensayo enzimático quimioluminiscente en fase sólida (SPCEI) son igualmente convenientes.
5. Los resultados obtenidos favorecerán la unificación de criterios para la selección de métodos y técnicas con el fin de establecer en futuros trabajos una metodología común que haga comparables los unos con los otros.
6. Se abordó por primera vez el impacto de la variación en la disponibilidad de alimento en la competencia trófica en monos araña (*Ateles geoffroyi*).

7. Un grupo familiar de monos araña (*Ateles geoffroyi*) en cautiverio respondió a la centralización de alimentos reduciendo el tiempo de alimentación y aumentando los niveles de metabolitos de glucocorticoides fecales.
8. Estas respuestas probablemente estén vinculadas a un aumento en la competencia trófica cuando se concentran los alimentos, lo que resalta la trascendencia de la disponibilidad de alimento en monos araña.
9. Los resultados sugieren que, en libertad, es posible que la dispersión de los alimentos es un factor que podría disminuir las diferencias entre individuos en la prioridad de acceso a los recursos alimenticios, lo que reduce las diferencias interindividuales en las actividades tróficas y el estrés fisiológico.
10. Por primera vez se midió la amplitud del nicho isotópico, que es un proxy de la amplitud del nicho trófico, en dos especies de platirrinos: monos aulladores de manto (*Alouatta palliata*) y negros (*A. pigra*), en condiciones de alopatria y simpatria y se evaluó si presentaban partición de nicho utilizando mediciones isotópicas en pelo.
11. Las estimaciones bayesianas de las áreas de elipse de desviación estándar mostraron que en alopatria, la amplitud del nicho isotópico y la variación isotópica fueron similares en ambas especies. En simpatria, los monos aulladores negros tuvieron un nicho isotópico significativamente más amplio, que estaba determinado principalmente por los altos valores de $\delta^{15}\text{N}$, e incluía la mayor parte del nicho isotópico de los monos aulladores de manto. El nicho isotópico de los monos aulladores de manto no fue diferente entre simpatria y alopatria.
12. El área de solapamiento más alta fue entre los nichos isotópicos de ambas especies que vivían en simpatria.
13. En esta zona, las métricas de diversidad isotópica (similitud y anidamiento) demostraron que, a pesar de compartir la misma área, cada especie presenta diferente forma y tamaño de nicho isotópico.
14. La coexistencia de estas especies ecológicamente similares está vinculada a ajustes de nicho trófico por una especie: *A. pigra*.

Anexos

Anexo 1. Datos de crecimiento del pelo

Usamos 5 cm de pelo abdominal de monos aulladores (*Alouatta palliata* y *A. pigra*) en nuestro análisis de isótopos estables ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$). Para establecer un marco de tiempo para la incorporación de isótopos estables en el pelo a través de aportes dietéticos, utilizamos el siguiente procedimiento. En un individuo adulto de cada especie, cortamos el pelo en un área de 2 x 2 cm en la zona abdominal lo más cerca posible de la piel con unas tijeras quirúrgicas de punta fina, con cuidado de no dañar la piel. Estos individuos fueron alojados en el Parque Zoológico Miguel A. de Quevedo (Veracruz, México) y fueron manejados fácilmente sin anestesia. Luego medimos el crecimiento del pelo en 10 muestras (seleccionados al azar) a intervalos de 7 días con un calibrador digital Mitutoyo (Mitutoyo Corporation, Takatsu-ku, Japón) al 0.01 cm más cercano, por un total de 35 días. Repetimos el procedimiento una vez para cada individuo. El crecimiento semanal del pelo fue muy similar entre turnos en cada individuo y también entre individuos (Tabla Anexo1). Durante un período de 35 días, el pelo en *A. palliata* creció una media de 5,5 mm y de 6,1 mm en *A. pigra*. Por lo tanto, 5 cm de pelo corresponden a 318.2 días y 288.8 días de depósito de isótopos en el pelo de *A. palliata* y *A. pigra*, respectivamente. Por lo tanto, estos son los plazos para la deposición de isótopos en el pelo de los monos aulladores en el presente estudio.

Tabla A1. Crecimiento de pelo en dos monos aulladores.

Turno	Día	<i>A. palliata</i>		<i>A. pigra</i>	
		Longitud ^a	Crecimiento	Longitud	Crecimiento
1	0	0.00	—	0.00	—
	7	2.26	2.26	2.45	2.45
	15	3.48	1.22	3.88	1.43
	21	4.60	1.12	4.17	0.30
	28	5.09	0.49	4.94	0.77
	35	6.01	0.92	5.87	0.93
2	0	0.00	—	0.00	—
	7	2.51	2.51	2.55	2.55
	15	3.32	0.81	3.97	1.42
	21	3.74	0.41	4.29	0.32
	28	4.18	0.44	5.01	0.72
	35	5.04	0.86	6.23	1.22

^a En mm. Valores promedio para las longitudes de 10 pelos.

Anexo 2. Datos resumidos de los 36 grupos de monos aulladores analizados

En la Tabla A2 se describe a detalle la composición de los distintos grupos de monos aulladores (*Alouatta palliata* y *A. pigra*) capturados para la obtención de muestras de pelo para el subsiguiente análisis de isótopos estables. Las regiones de alopatria son Campeche, Guatemala para *A. pigra* y Veracruz para *A. palliata*. Tabasco es la zona de simpatria de ambas especies. Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ representan la media de los valores individuales que consituyen cada grupo.

Tabla A2. Datos resumidos de los 36 grupos de monos aulladores analizados.

^a*A. pi*=*Alouatta palliata*; *A. pa*=*Alouatta palliata*; TG=Tamaño de grupo; M=machos; H=hembras; SA=subadultos; J=juveniles; I=infantes; Área=área del fragmento (ha).

Región	ID Grupo	Especies ^a	TG	M	H	S	J	I	Área	δ ³ C	δ ⁵ N
Campeche	Chicbul	<i>A. pi</i>	8	2	3	1	0	2	7	-24.26	3.79
	Tormento 158	<i>A. pi</i>	4	2	2	0	0	0	1010	-24.27	3.79
	Tormento 151	<i>A. pi</i>	12	3	5	0	4	0	1010	-24.45	3.86
	Tormento 168	<i>A. pi</i>	3	1	2	0	0	0	1020	-24.28	3.05
	Tormento 161	<i>A. pi</i>	6	1	2	2	1	0	1020	-24.41	2.94
	Calakmul	<i>A. pi</i>	4	1	2	0	1	0	140000	-24.45	4.58
	Álamo	<i>A. pi</i>	2	1	1	0	0	0	93	-25.22	3.51
Guatemala	Manantiales	<i>A. pi</i>	2	1	1	0	0	0	3	-24.18	3.60
	El Chal	<i>A. pi</i>	8	2	5	1	0	0	23	-24.66	3.71
Tabasco	Doña Elena	<i>A. pi</i>	2	1	1	0	0	0	2	-25.93	5.76
	Félix 2008	<i>A. pi</i>	7	2	3	1	0	1	11	-25.96	6.92
	Félix 2010	<i>A. pi</i>	9	2	4	1	2	0	11	-26.02	6.66
	Huerta	<i>A. pi</i>	5	1	2	1	1	0	4	-25.87	5.45
	Santiago	<i>A. pi</i>	8	2	4	0	2	0	5	-25.41	6.31
	Silvano	<i>A. pi</i>	6	1	2	0	2	1	1	-25.23	5.56
	Jose Morales	<i>A. pi</i>	2	1	1	0	0	0	0	-25.12	6.81
	Madero Bajo	<i>A. pi</i>	3	1	2	0	0	0	3	-24.93	3.84
	Elías	<i>A. pi</i>	3	0	3	0	0	0	2	-25.2	5.15
	Acahual pigra	<i>A. pi</i>	6	1	3	0	2	0	17	-25.31	3.51
	Dago	<i>A. pi</i>	6	1	4	0	1	0	33	-25.03	3.67
	Roco	<i>A. pi</i>	5	1	2	1	1	0	33	-25.1	4.24
	CGreen puente	<i>A. pi</i>	3	1	2	0	0	0	5	-25.43	3.81
	CGreen escuela	<i>A. pa</i>	2	0	2	0	0	0	3	-25.54	4.20
	CGreen casa	<i>A. pa</i>	3	2	1	0	0	0	5	-25.97	4.53
	Amilcar 333	<i>A. pa</i>	10	2	6	1	1	0	4	-25.49	4.16
	Amilcar 334	<i>A. pa</i>	2	1	1	0	0	0	10	-25.03	3.57
	Amilcar 330	<i>A. pa</i>	5	1	2	0	0	2	10	-25.3	4.07
	Rafael	<i>A. pa</i>	7	4	1	1	1	0	5	-25.13	3.26
	El Negro	<i>A. pa</i>	7	2	4	0	1	0	2	-25.01	5.43
	Gran Poder 1	<i>A. pa</i>	4	2	2	0	0	0	2	-25.43	3.55
	Gran Poder 2	<i>A. pa</i>	6	1	3	1	1	0	1	-25.49	2.99
	Acahual palliata	<i>A. pa</i>	5	1	3	0	1	0	17	-25.26	3.21
	Milagros	<i>A. pa</i>	21	4	13	1	3	0	33	-25.56	3.87
	Calicanto	<i>A. pa</i>	5	1	3	1	0	0	8	-25.5	4.68
Veracruz	La Flor	<i>A. pa</i>	6	2	3	1	0	0	68	-25.04	2.78
	Jalapilla	<i>A. pa</i>	6	4	1	1	0	0	6	-25.1	4.53

